

## Лекция 1

### Тема 1. Введение.

Микроорганизмы - важнейшие объекты селекции продуцентов. Цели и задачи селекции продуцентов. Основные направления развития селекции продуцентов.

Понятие о первичных и вторичных метаболитах.

Основные объекты биотехнологии. Перспективные группы биологических агентов: рекомбинанты, термофильные микроорганизмы и ферменты, анаэробные микроорганизмы, ассоциации микроорганизмов, иммобилизованные биологические агенты, вирусы. Сравнительная характеристика биологических агентов, их особенности. Нанобиотехнология. Нанобактерии.

**12 методов в картинках: генная инженерия. Часть II: инструменты и техники** <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-ii-instrumenty-i-tehniki>

(интересно: много схем и фото)



**Рисунок 16. Оснащение лаборатории, где занимаются генной инженерией бактерий. Не всё здесь обязательно, и не всё обязательное здесь есть. Верхний ряд:** ламинар ([БАВнп-01-1,5, «Ламинарные системы»](#)), качалка орбитальная (GFL Orbital Shaker 3019), амплификатор для ПЦР в реальном времени ([Agilent Technologies Stratagene Mx3005P QPCR System](#)), система для автоматизированного выделения биополимеров ([QIAcube, QIAGEN](#)). **Средний ряд:** микроцентрифуга ([MiniSpin, Eppendorf](#)), оборудование для горизонтального электрофореза, трансиллюминатор и то, что на нём обычно видно, гелъдокументирующая система ([Doc-Print VX5](#)). **Нижний ряд:** набор микропипеток, [репликатор](#) и плашка для него (при клонировании чаще используют круглый вариант, для чашек Петри), микропробирки в штативе, «микробиологический минимум» — чашки Петри, петли, горелка.

## 1.1 ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология - одна из бурно развивающихся отраслей биологии. К настоящему времени в мире создано более 3000 компаний, производящих антибиотики, аминокислоты, ферменты и другие биологически активные вещества.

Микроорганизмы - бактерии, дрожжи и микроскопические мицелиальные грибы - основные промышленные объекты биотехнологии.

Человек с давних времен использовал деятельность микроорганизмов для выпечки хлеба и пивоварения, получения вина и уксуса, приготовления молочнокислых продуктов.

Микроорганизмы имеют высокую скорость роста, способны расти на дешевых питательных средах и обладают пластичным метаболизмом, протекающим с высокой скоростью и эффективностью. Так, например, КПД превращения углерода субстрата в углерод клеточной биомассы в клетках *Escherichia coli* составляет 70 %. Все это дает предпосылки для использования клеток микроорганизмов в производстве различных биологически активных веществ.

Однако метаболизм клетки подвержен строгой и четкой регуляции. Микроорганизмы синтезируют такое количество первичных метаболитов, которое необходимо для роста и деления клетки.

Для использования штамма микроорганизма в качестве промышленного продуцента эта регуляция должна быть изменена таким образом, чтобы использовать биосинтетический аппарат клетки для получения максимального количества необходимого метаболита, т. е. создания непрерывного синтеза.

Решение этой задачи существенно облегчается, если известен путь биосинтеза интересующего нас метаболита и его регуляция, что дает возможность разработать подходы для дерегуляции определенных этапов этого синтеза путем насыщения генома продуцента необходимыми мутациями.

Получение промышленных штаммов микроорганизмов долгое время основывалось на внесении в геном клетки индуцированных мутаций и отборе лучших вариантов. Этот метод очень трудоемок и может занимать длительное время. Однако его использование приводит к значительному увеличению уровня продукции метаболита. Так, с помощью ступенчатого отбора штаммов-продуцентов пенициллина уровень активности штамма микроорганизма был увеличен от 100 ед/мл до 40 000 ед/мл.

С 70-х гг. прошлого века начинается целенаправленное конструирование штаммов продуцентов различных биологически активных веществ с использованием методов генетической инженерии.

Первые штаммы-продуценты конструировались на основе клеток *Escherichia coli*. В 1977-1979 гг. на основе этих бактерий были созданы штаммы-продуценты соматостатина, инсулина и гормона роста человека. В настоящее время круг микроорганизмов, на основе которых конструируют генно-инженерные штаммы-продуценты, существенно расширен.

Основное преимущество микроорганизмов как объекта селекции продуцентов - более простая, по сравнению с эукариотами, организация генетического аппарата. Поэтому клонирование генов в клетки растений и животных осуществляется на основе первичного их клонирования в микробных клетках.

Методы современной селекции продуцентов основываются на генетическом конструировании *in vivo* и *in vitro*.

#### **Генетическое конструирование *in vivo*:**

позволяет получить и выделить мутанты, используя различные способы обмена генетической информацией между живыми микробными клетками: гибридизацию, конъюгацию, трансформацию, трансдукцию, транспозонный мутагенез и слияние протопластов

#### **Генетическое конструирование *in vitro*:**

основано на введении индивидуальных фрагментов ДНК в живую клетку с получением рекомбинантных генетических структур с заданными свойствами.

Стратегия селекционной работы с микроорганизмами заключается в поиске природных форм, которые обладают какими-либо полезными для человека свойствами (синтез ценных соединений, высокая скорость роста, способность к усвоению дешевых и доступных субстратов и т. д.), а также дальнейшем их улучшении, создании на их основе промышленных штаммов. Эта задача решается обычно путем изменения регуляции метаболической активности клетки.

Современные тенденции развития селекции продуцентов - конструирование промышленных штаммов с заданными свойствами с использованием новейших достижений фундаментальных отраслей биологии в сочетании с приемами классической селекции.

## 1.2 БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Характер биологической системы (микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы) исключительно важен для биотехнологического процесса. Во многих случаях именно генетически модифицированная самовоспроизводящаяся биологическая единица (микроорганизм, вирус, растение или животное) является конечным коммерческим продуктом.

Прокариоты и эукариоты. Все живые организмы принято делить на две основные группы: прокариоты и эукариоты. Приблизительно 1,5 млрд лет назад произошел переход от маленьких клеток со сравнительно простой внутренней структурой (так называемых прокариот, к которым относятся различные бактерии) к большим по размеру и значительно более сложно устроенным эукариотическим клеткам, подобным клеткам высших животных и растений.

### Основные структурные различия про- и эукариот:

- ✓ наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- ✓ строение и химический состав клеточной стенки;
- ✓ наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

В прокариотической бактериальной клетке хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой. В клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В оптимальных условиях прокариотическая клетка может делиться каждые 20 мин и таким образом давать жизнь более 10 млрд клеток менее чем за сутки.

В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре. В цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы: мембраны, окружающие ядро, митохондрии, образующие лабиринт эндоплазматического ретикулума (ЭПР), где синтезируются липиды и мембранные белки. Мембраны формируют стопки уплощенных пузырьков, составляющих аппарат Гольджи, который участвует в синтезе и транспорте различных органических молекул. Мембраны окружают лизосомы (субклеточные структуры диаметром 0,20-0,5 мкм), содержащие гидролитические ферменты, необходимые для внутриклеточного пищеварения.

Мембраны, таким образом, защищают от действия этих ферментов белки и нуклеиновые кислоты самой клетки. Мембраны также окружают пероксисомы, содержащие окислительные ферменты, производящие и разрушающие опасные высокорекреационоспособные перекиси (пероксиды). Обмен между внутриклеточными, окруженными мембранами структурами и внеклеточной средой происходит с помощью эндоцитоза.

Различают две группы бактерий – зубактерии, населяющие почву, воду и другие организмы, и архебактерии, встречающиеся в таких средах обитания, как болота, океанские глубины, очень соленые воды и горячие кислые источники.

Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их подразделяют на термофилы (от 45 до 90°C и выше), мезофилы (от 10 до 47°C) и психрофилы или психротрофы (от -5 до 35°C). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур – полезный инструмент для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, а генетически видоизмененные психротрофы используются при пониженной температуре для биodeградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде.

Среди множества биологических объектов, используемых в биотехнологии, основными «рабочими лошадками» являются бактерии *Escherichia coli*, одноклеточные дрожжи *Sacharomyces cerevisiae* и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами.

*E. coli* - грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Традиционная среда ее обитания с кишечник человека, может также высеваться из почвы и воды. Штаммы *E. coli* культивируются на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода. *E. coli* можно культивировать в аэробных и анаэробных условиях, но для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются содержанием в питательной среде растворенного кислорода, для этого в ферментерах создают условия аэрации.

Кроме *E. coli* в МБТ используют множество других микроорганизмов, которые подразделяют на две группы:

микроорганизмы как источники специфических генов (например, ген, кодирующий стабильную ДНК-полимеразу, которая используется в широко применяемой полимеразной цепной реакции - ПЦР; этот ген был выделен из термофильных бактерий и клонирован в *E. coli*).

микроорганизмы, созданные генноинженерными методами для решения определенных задач (например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, генетически модифицированные с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот).

*Saccharomyces cerevisiae* - непатогенные одноклеточные организмы диаметром клетки около 5 мкм. Во многих отношениях представляют эукариотический аналог *E. coli*. *S. cerevisiae* размножаются почкованием, их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ. Издавна использовалась для изготовления напитков и хлеба. Клетки дрожжей делятся каждые 1,5-2 ч. *S. cerevisiae* является удобной моделью для исследования других эукариот, в т.ч. человека, так как многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Генетическая система дрожжей является неизменным участником всех исследований по изучению ДНК человека.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто подвергают ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения, что необходимо для правильного функционирования белка. Однако *E. coli* и другие прокариоты способны осуществлять эту модификацию, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae* и другие виды дрожжей.

В качестве биологических систем в МБТ используют культуру эукариотических клеток. Кусочек ткани определенного организма (насекомого, растения, млекопитающего) обрабатывают протеолитическими ферментами (трипсином), расщепляющими белки межклеточного материала; при работе с растительными клетками используют ферменты, разрушающие клеточную стенку. Высвободившиеся клетки помещают в питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу, факторы роста. В этих условиях (деление клеток млекопитающих происходит примерно раз в сутки) на стенке емкости с культурой образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, рост прекращается. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут.

### **1.3 БИООБЪЕКТЫ КАК СРЕДСТВА ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ, ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ.**

Главным звеном биотехнологического процесса, определяющим всю его сущность, является биологический объект, способный осуществлять определенную модификацию исходного сырья и образовывать тот или иной необходимый продукт. **В качестве таких объектов биотехнологии могут выступать клетки микроорганизмов, животных и растений, трансгенные животные и растения, а также многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты.**

Основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов. К сожалению, объекты растительного и животного происхождения в силу ряда причин еще не нашли столь широкого применения.

Независимо от природы объекта, первичным этапом разработки любого биотехнологического процесса является получение чистых культур организмов (если это микробы), клеток или тканей (если это более сложные организмы – растения или животные). Многие этапы дальнейших манипуляций с последними (т.е. с клетками растений или животных), по сути дела, являются принципами и методами, используемыми в микробиологических производствах. И культуры микробных клеток, и культуры тканей растений и животных с методической точки зрения практически не отличаются от культур микроорганизмов. Поэтому дальнейшие рассуждения целесообразно вести применительно к микробиологическим объектам. Мир микроорганизмов крайне разнообразен. В настоящее время относительно хорошо охарактеризовано (или известно) более 100 тысяч различных их видов. Это в первую очередь прокариоты (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии) и часть эукариот (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие и водоросли). При столь большом разнообразии микроорганизмов весьма важной, а зачастую и сложной, проблемой является правильный выбор именно того организма, который способен обеспечить получение требуемого продукта, т. е. служить промышленным целям. Разделение микроорганизмов на промышленные и непромышленные для лиц, далеких от микробиологии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, кажется достаточно определенным: те микроорганизмы, которые используются в промышленном производстве – промышленные, а те, которые не используются, – непромышленные.

Однако для тех, кто близко соприкасается с вышеперечисленными отраслями биологических знаний, граница проходит между немногочисленной, но глубоко изученной группой микроорганизмов, служащих модельными объектами при исследованиях фундаментальных жизненных процессов, и всеми остальными микроорганизмами, которые, как правило, генетиками, молекулярными биологами и генными инженерами не изучались совсем или изучались в очень ограниченной степени. К числу первых относятся кишечная палочка (*E. coli*), сенная палочка (*Bac. subtilis*) и пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*). Во многих биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS («generally recognized as safe» обычно считаются безопасными). К таким микроорганизмам относят бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*. Сюда также относят виды грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и дрожжей *Saccharomyces* и др. GRAS-микроорганизмы непатогенные, нетоксичные и в основном не образуют антибиотики, поэтому при разработке нового биотехнологического процесса следует ориентироваться на данные микроорганизмы, как базовые объекты биотехнологии. Микробиологическая промышленность сегодня использует тысячи штаммов из сотен видов микроорганизмов, которые первично были выделены из природных источников на основании их полезных свойств, а затем (в большинстве своем) улучшены с помощью различных методов. В связи с расширением производства и ассортимента выпускаемой продукции в микробиологическую промышленность вовлекаются все новые и новые представители мира микробов. Следует отдавать себе отчет, что в обозримом будущем ни один из них не будет изучен в той же степени, как *E.coli* и *Bac.subtilis*. И причина этого очень простая – колоссальная трудоемкость и высокая стоимость подобного рода исследований.

Следовательно, возникает проблема разработки стратегии и тактики исследований, которые обусловили бы с разумной затратой труда извлечь из потенциала новых микроорганизмов все наиболее ценное при создании промышленно важных штаммов-продуцентов, пригодных к использованию в биотехнологических процессах.

Классический подход заключается в выделении нужного микроорганизма из природных условий.

Из естественных мест обитания предполагаемого продуцента отбирают образцы материала (берут пробы материала) и производят посев в элективную среду, обеспечивающую преимущественное развитие интересующего микроорганизма, т. е. получают так называемые накопительные культуры.

Следующим этапом является выделение чистой культуры с дальнейшим дифференциально-диагностическим изучением изолированного микроорганизма и, в случае необходимости, ориентировочным определением его продукционной способности.

Существует и другой путь подбора микроорганизмов-продуцентов – это выбор нужного вида из имеющихся коллекций хорошо изученных и досконально охарактеризованных микроорганизмов. При этом, естественно, устраняется необходимость выполнения ряда трудоемких операций.

Главным критерием при выборе биотехнологического объекта (в нашем случае микроорганизма-продуцента) является способность синтезировать целевой продукт. Однако помимо этого, в технологии самого процесса могут закладываться дополнительные требования, которые порой бывают очень и очень важными, чтобы не сказать решающими.

В общих словах микроорганизмы должны:

обладать высокой скоростью роста;

- утилизировать необходимые для их жизнедеятельности дешевые субстраты;
- быть резистентными к посторонней микрофлоре, т. е. обладать высокой конкурентоспособностью.

Все вышеперечисленное обеспечивает значительное снижение затрат на производство целевого продукта. Конечно, в каждом конкретном случае ведущим является какой-то один из этих критериев, поскольку в природе устроено так, что во всем получить выигрыш не удастся никогда.

И это правило необходимо постоянно иметь в виду. Ниже приводятся примеры, имеющие своей целью проиллюстрировать ранее сказанное.

1. Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями роста и синтетических процессов, чем высшие организмы. Тем не менее это присуще не всем микроорганизмам. Существуют такие из них (например, олиготрофные), которые растут крайне медленно, однако они представляют известный интерес, поскольку способны продуцировать различные очень ценные вещества.

2. Особое внимание как объекты биотехнологических разработок представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие в своей жизнедеятельности энергию солнечного света.

Часть из них (цианобактерии и фотосинтезирующие эукариоты) в качестве источника углерода утилизируют  $\text{CO}_2$ , а некоторые представители цианобактерий, ко всему сказанному, обладают способностью усваивать атмосферный азот (т. е. являются крайне неприхотливыми к питательным веществам). Фотосинтезирующие микроорганизмы перспективны как продуценты аммиака, водорода, белка и ряда органических соединений. Однако прогресса в их использовании вследствие ограниченности фундаментальных знаний об их генетической организации и молекулярно-биологических механизмах жизнедеятельности, по всей видимости, следует ожидать не в скором будущем.

3. Определенное внимание уделяется таким объектам биотехнологии, как термофильные микроорганизмы, растущие при  $60\text{--}80^\circ\text{C}$ . Это их свойство является практически непреодолимым препятствием для развития посторонней микрофлоры при относительно нестерильном культивировании, т. е. является надежной защитой от загрязнений. Среди термофилов обнаружены продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Кроме того, скорость их роста и метаболическая активность в 1,5–2 раза выше, чем у мезофилов.

Ферменты, синтезируемые термофилами, характеризуются повышенной устойчивостью к нагреванию, некоторым окислителям, детергентам, органическим растворителям и другим неблагоприятным факторам. В то же время они мало активны при обычных температурах. Так, протеазы одного из представителей термофильных микроорганизмов при  $20^\circ\text{C}$  в 100 раз менее активны, чем при  $75^\circ\text{C}$ . Последнее является очень важным свойством для некоторых промышленных производств. Например, широкое применение в генетической инженерии нашел фермент Taq-полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Ранее уже упоминалось о еще одном весьма существенном свойстве этих организмов, а именно, что при их культивировании температура среды, в которой они пребывают, значительно превышает температуру окружающей среды. Данный высокий перепад температур обеспечивает быстрый и эффективный обмен тепла, что позволяет использовать биологические реакторы без громоздких охлаждающих устройств. А последнее, в свою очередь, облегчает перемешивание, аэрацию, пеногашение, что в совокупности значительно удешевляет процесс.

*Селекция.* Неотъемлемым компонентом в процессе создания наиболее ценных и активных продуцентов, т. е. при подборе объектов в биотехнологии, является их селекция. А генеральным путем селекции является сознательное конструирование геномов на каждом этапе отбора нужного продуцента. Такая ситуация не всегда могла быть реализована, вследствие отсутствия эффективных методов изменения геномов селектируемых организмов.

В развитии микробных технологий в свое время сыграли (да и сейчас еще продолжают играть!) очень важную роль методы, базирующиеся на селекции спонтанно возникающих измененных вариантов, характеризующихся нужными полезными признаками. При таких методах обычно используется ступенчатая селекция: на каждом этапе отбора из популяции микроорганизмов отбираются наиболее активные варианты (спонтанные мутанты), из которых на следующем этапе отбирают новые, более эффективные штаммы. И так далее.

Несмотря на явную ограниченность данного метода (приема), заключающуюся в низкой частоте возникновения мутантов, возможности его рано считать полностью исчерпанными. Процесс селекции наиболее эффективных продуцентов значительно ускоряется при использовании метода индуцированного мутагенеза. В качестве мутагенных воздействий применяются УФ, рентгеновское и гамма-излучения, определенные химические вещества и др. Однако и этот прием также не лишен недостатков, главным из которых является его трудоемкость и отсутствие сведений о характере изменений, поскольку экспериментатор ведет отбор по конечному результату. Например, устойчивость организма к ионам тяжелых металлов может быть связана с подавлением системы поглощения данных катионов бактериальной клеткой, активацией процесса удаления катионов из клетки или перестройкой системы (систем), которая подвергается ингибирующему действию катиона в клетке. Естественно, знание механизмов повышения устойчивости позволит вести направленное воздействие с целью получения конечного результата за более короткое время, а также селективировать варианты, лучше подходящие к конкретным условиям производства. Таким образом, тенденцией сегодняшнего дня является сознательное конструирование штаммов микроорганизмов с заданными свойствами на основе фундаментальных знаний о генетической организации и молекулярно-биологических механизмах осуществления основных функций организма.

Короче говоря, применение перечисленных подходов в сочетании с приемами классической селекции является сутью современной селекции микроорганизмов-продуцентов. Селекция микроорганизмов для микробиологической промышленности и создание новых штаммов часто направлены на усиление их продукционной способности, т.е. образование того или иного продукта. Решение этих задач в той или иной степени связано с изменением регуляторных процессов в клетке, поэтому в настоящем разделе имеет смысл несколько задержаться на возобновлении сведений о регуляции биохимической активности бактериальной клетки. Как известно, изменения скорости биохимических реакций у бактерий может осуществляться по крайней мере двумя путями. Один из них очень быстрый (реализующийся в течение секунд или минут) заключается в изменении каталитической активности индивидуальных молекул фермента.

Второй, более медленный (реализуется в течение многих минут), состоит в изменении скоростей синтеза ферментов. В обоих механизмах используется единый принцип управления системами – принцип обратной связи, хотя существуют и более простые механизмы регуляции активности метаболизма клетки.

Самый простой способ регуляции любого метаболического пути основывается на доступности субстрата или наличии фермента. Действительно, снижение количества субстрата (его концентрации в среде) приводит к снижению скорости потока конкретного вещества через данный метаболический путь. С другой стороны, повышение концентрации субстрата приводит к стимулированию метаболического пути. Поэтому, независимо от каких-то иных факторов, наличие (доступность) субстрата следует рассматривать как потенциальный механизм любого метаболического пути. Иногда эффективным средством повышения выхода целевого продукта является увеличение концентрации в клетке какого-либо определенного предшественника. Аналогичный эффект может быть получен и в результате повышения концентрации ферментов, что достигается, например, амплификацией генов, контролирующих синтез соответствующего фермента. Наиболее распространенным способом регуляции активности метаболических реакций в клетке является регуляция по типу ретроингибирования. Биосинтез многих первичных метаболитов характеризуется тем, что при повышении концентрации конечного продукта данного биосинтетического пути угнетается активность одного из первых ферментов этого пути.

Впервые о наличии такого регуляторного механизма было сообщено в 1953 г. А. Novik и L. Szillard, исследовавшими биосинтез триптофана клетками *E. coli*. Заключительный этап биосинтеза данной ароматической аминокислоты состоит из нескольких, катализируемых индивидуальными ферментами стадий. Указанными авторами было обнаружено, что у одного из мутантов *E. coli* с нарушенным биосинтезом триптофана добавление данной аминокислоты (являющейся конечным продуктом этого биосинтетического пути) резко тормозит накопление одного из предшественников – индол глицерофосфата в клетках. Уже тогда было высказано предположение, что триптофан ингибирует активность какого-то фермента, катализирующего образование индол глицерофосфата.

Несколько позднее было четко установлено, что таким чувствительным к триптофану ферментом является антранилатсинтетаза, которая катализирует более раннюю реакцию триптофанового пути - образование антранилата из хоризмата и глутамин. Этот факт был экспериментально обоснован в опыте, когда добавление триптофана в клеточные экстракты *E. coli*, содержащие фермент антранилатсинтетазу и его субстраты (хоризмат и глутамин), приводило к резкому ингибированию образования антранилата.

Более того, было однозначно продемонстрировано, что активность анранилатсинтетазы подавляется только триптофаном и никакие другие метаболиты клетки подобного действия не оказывают. Существует мнение, что регуляция по типу ретроингибирования является общим свойством клеточного метаболизма. Более тщательное изучение механизма ингибирования активности фермента метаболитами этого же пути, проведенное в условиях *in vitro*, показало, что метаболит, являющийся ингибитором, специфически связывается с участком молекулы фермента, обладающим высокой степенью сродства к данному ингибитору и абсолютно отличающимся от активного центра фермента (т. е. не перекрывающимся с каталитическим центром). Этот участок получил название аллостерического центра (от греч. "аллос" – другой, "стерос" – пространственный), а сами ферменты, обладающие подобным центром, стали называться аллостерическими ферментами. Аллостерические ферменты представляют собой олигомеры, состоящие из взаимодействующих между собой нескольких одинаковых или различающихся субъединиц. При взаимодействии фермента с ингибитором конформация его молекулы изменяется, активный центр при этом также претерпевает изменения, приводящие к утрате каталитической способности фермента. При мутационном изменении аллостерического центра (центра взаимодействия с ингибитором) чувствительность к ингибитору утрачивается и фермент сохраняет свою активность, обеспечивая требуемый для синтеза конечного продукта этап биосинтетического пути.

Зная точно механизм регуляции синтеза интересующего продукта, участвует ли в регуляции механизм ретроингибирования, можно попытаться получить более активный продуцент данного соединения. Для отбора таких продуцентов используют структурные аналоги метаболитов, по отношению к которым селекционируют резистентные варианты. Например, 5-метилтриптофан, аналог триптофана, так же как и триптофан, ингибирует активность анранилатсинтетазы, но не заменяет собой триптофан в клеточном метаболизме, т. е. не способен включаться в клеточные белки без потери последними биологической активности.

Вследствие этого данный структурный аналог необходимого метаболита задерживает рост бактерий, если он добавлен в питательную среду,

Некоторые мутанты, устойчивые к ингибирующему действию 5-метилтриптофана, способны синтезировать значительные количества триптофана и выделять его во внешнюю среду, а анранилатсинтетаза у них оказывается нечувствительной к триптофану, т. е. не подвержена ретроингибированию этой аминокислотой. Такой методический прием часто используется в селекции продуцентов аминокислот, нуклеотидов и витаминов.

Если же необходимо добиться накопления (продукции) какого-нибудь промежуточного продукта биосинтетического пути, то следует получить мутант с заблокированным за этим продуктом этапом. Такой мутант будет зависимым от наличия в среде выращивания вещества, являющегося продуктом заблокированного этапа, либо конечного продукта данного биосинтетического пути.

Давно установлено, что из тысяч ферментов, синтезируемых растущими клетками, одни образуются постоянно и независимо от состава питательной среды, в то время как другие появляются лишь тогда, когда в среде присутствует субстрат их действия. Первые называются конститутивными ферментами (это ферменты гликолиза и др.), вторые относятся к адаптивным или индуцибельным ферментам. Так, клетки *E.coli*, растущие на среде с глюкозой, обладают следовыми количествами ферментов метаболизма лактозы, а также многих других источников углерода, которые способны усваивать клетки данного микроорганизма.

Но если эти же клетки перенести на среду с лактозой, являющейся в данном случае единственным источником углерода и энергии, то уже через 1–2 минуты можно зарегистрировать повышение активности  $\beta$ -галактозидазы, ключевого фермента в утилизации лактозы. Этот фермент гидролизует лактозу до глюкозы и галактозы. В течение следующего непродолжительного периода (равного 20–180 минутам) активность  $\beta$ -галактозидазы повышается примерно в 1000 раз по сравнению с исходным уровнем. Иными словами, имеет место выраженная индукция фермента, которая может быть определена следующим образом:

Индукция фермента – это относительное увеличение скорости его синтеза в ответ на появление в среде культивирования определенного химического соединения, называемого индуктором. Часто великолепными индукторами являются не утилизируемые аналоги субстратов. Например, для  $\beta$ -галактозидазы таким веществом служит изопропил- $\beta$  – D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) неметаболизируемый аналог лактозы. С другой стороны, не всегда субстрат является индуктором синтеза соответствующего ему фермента. Так, лактоза, прежде чем выступить в роли индуктора, должна сначала превратиться в свой изомер аллолактозу (под действием  $\beta$ -галактозидазы).

Механизм генетической регуляции процесса индукции ферментов был расшифрован в экспериментах на кишечной палочке при изучении синтеза упоминавшегося фермента утилизации лактозы- $\beta$ -галактозидазы.

В 1961 г. F. Jacob и J. Monod на основании результатов генетического и биохимического изучения процесса утилизации лактозы бактериями *E.coli* K 12 сформулировали концепцию, получившую широкую известность как "модель оперона". В соответствии с этой моделью данная система регуляции состоит из четырех компонентов: структурных генов (детерминирующих структуру ферментов), гена-регулятора, оператора и промотора.

Ген-регулятор определяет структуру белка-репрессора, способного связываться с оператором, который, в свою очередь, контролирует функционирование прилежащих к нему структурных генов.

Промотор представляет собой область для связывания с ферментом транскрипции – РНК-полимеразой. Если белок-репрессор связан с оператором, то РНК-полимераза не может перемещаться на промотор и синтез информационной РНК не может осуществляться. Результатом является отсутствие синтеза соответствующих ферментов. Первым из подробно изученных оперонов является лактозный оперон кишечной палочки. Авторы концепции предположили, что репрессор является аллостерическим белком, обладающим двумя специфическими центрами один из которых характеризуется сродством к нуклеотидной последовательности области оператора, а другой – к молекуле индуктора.

Взаимодействие индуктора с репрессором снижает сродство последнего (вследствие изменения центра связывания с оператором) к оператору, результатом чего является освобождение оператора. Репрессор *lac*-оперона выделен в чистом виде и состоит из четырех идентичных субъединиц (общая молекулярная масса равна 150 000 дальтон). Каждая субъединица взаимодействует с одной молекулой индуктора (т. е. требуется четыре молекулы индуктора, чтобы инактивировать репрессор).

Репрессор в чистом виде характеризуется исключительно высоким сродством к оператору и эффективно связывается с нуклеотидной последовательностью *lac*-оператора в условиях *in vitro*. В присутствии индуктора связывание нарушается. Изложенные результаты выполненных экспериментов являются веским подтверждением гипотезы Jacob и Monod, которая в настоящее время считается полностью доказанной.

Известно, что мутации в последовательностях гена-регулятора или оператора приводят в определенных случаях к нарушению либо образования полноценного репрессора, либо к нарушению его сродства к оператору. И в том, и в другом случае потребность в индукторе для запуска синтеза информационной РНК, а следовательно, и соответствующих ферментов, исчезает. Подобные мутанты (или мутации) называются конститутивными, поскольку синтез ферментов осуществляется постоянно. Получение конститутивных мутантов имеет важное значение в селекции определенных штаммов промышленных микроорганизмов.

Концепция оперона применима и к процессу репрессии ферментов. Отличием от индуцибельных систем в данном случае является наличие в таких оперонах не активного репрессора (апорепрессора), который в одиночку не способен взаимодействовать с оператором, но может активироваться конечным продуктом (корепрессором) с образованием активного репрессора.

Уже отмечалось, что с помощью аналога триптофана (5-метилтриптофана) располагающийся на значительном расстоянии от контролируемых им генов триптофанового оперона. Такие мутанты являются конститутивными вследствие либо полного отсутствия репрессора, либо в результате невозможности последнего активироваться триптофаном.

Таким образом, изменяя регуляцию индуцибельных и репрессибельных оперонов, существует возможность повышать продукционную активность определенных промышленных штаммов-продуцентов. Уместно отметить, что структурные гены одного метаболического пути не всегда объединены в единый оперон (наподобие лактозного), однако это не мешает их регуляции с помощью индукции или репрессии. Так, например, гены *E.coli*, детерминирующие структуру ферментов, обеспечивающих биосинтез аргинина, располагаются в различных областях хромосомы, но все контролируются одним и тем же геном-регулятором. Такая система образует регулон.

Другим показательным примером является SOS-регулон, гены которого детерминируют структуру более десятка различных белков и ферментов, участвующих в репарации повреждений ДНК клетки. Все эти структурные гены регулируются одним репрессором – продуктом гена *lexA*. Опероны и регулоны, контролирующие взаимосвязанные физиологические функции обнаружены у всех генетически изученных видов бактерий. Очень важным регуляторным элементом любого оперона является область ДНК, именуемая промотором. Этот участок оперона обеспечивает взаимодействие (связывание) с РНК-полимеразой для начала транскрипции (т. е. синтеза молекулы информационной РНК). От особенностей промотора зависит эффективность транскрипции. Мутации в области промотора, изменяя его активность, могут повышать или понижать экспрессию оперона. Данное свойство промоторов также используется в создании более активных продуцентов.

Большие перспективы в селекции продуцентов открывает генетическая инженерия, методы которой позволяют заменять регуляторные области катаболических оперонов на более эффективные промоторы, повышающие продукцию клетками биологически активных веществ и обеспечивающие новые возможности контроля активности генов.

Само собой разумеется, что это не единственные способы повышения продуктивности бактерий за счет изменения регуляторных механизмов.

Характер биологической системы (микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы) исключительно важен для биотехнологического процесса.

Во многих случаях именно генетически модифицированная самовоспроизводящаяся биологическая единица (микроорганизм, вирус, растение или животное) является конечным коммерческим продуктом.

Прокариоты и эукариоты. Все живые организмы принято делить на две основные группы: прокариоты и эукариоты. Приблизительно 1,5 млрд лет назад произошел переход от маленьких клеток со сравнительно простой внутренней структурой (так называемых прокариот, к которым относятся различные бактерии) к большим по размеру и значительно более сложно устроенным эукариотическим клеткам, подобным клеткам высших животных и растений.

Основные структурные различия про- и эукариот:

- наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- строение и химический состав клеточной стенки;
- наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

В прокариотической бактериальной клетке хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой. В клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В оптимальных условиях прокариотическая клетка может делиться каждые 20 мин и таким образом давать жизнь более 10 млрд клеток менее чем за сутки.

В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре. В цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы: мембраны, окружающие ядро, митохондрии, образующие лабиринт эндоплазматического ретикулума (ЭПР), где синтезируются липиды и мембранные белки. Мембраны формируют стопки уплощенных пузырьков, составляющих аппарат Гольджи, который участвует в синтезе и транспорте различных органических молекул. Мембраны окружают лизосомы (субклеточные структуры диаметром 0,20-0,5 мкм), содержащие гидролитические ферменты, необходимые для внутриклеточного пищеварения.

Мембраны, таким образом, защищают от действия этих ферментов белки и нуклеиновые кислоты самой клетки. Мембраны также окружают пероксисомы, содержащие окислительные ферменты, производящие и разрушающие опасные высокорекреационоспособные перекиси (пероксиды). Обмен между внутриклеточными, окруженными мембранами структурами и внеклеточной средой происходит с помощью эндоцитоза.

Различают две группы бактерий – зубактерии, населяющие почву, воду и другие организмы, и архебактерии, встречающиеся в таких средах обитания, как болота, океанские глубины, очень соленые воды и горячие кислые источники.

Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их подразделяют на термофилы (от 45 до 90°C и выше), мезофилы (от 10 до 47°C) и психрофилы или психротрофы (от -5 до 35°C). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур – полезный инструмент для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, а генетически видоизмененные психротрофы используются при пониженной температуре для биodeградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде.

Среди множества биологических объектов, используемых в биотехнологии, основными «рабочими лошадками» являются бактерии *Escherichia coli*, одноклеточные дрожжи *Sacharomyces cerevisiae* и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами.

*E. coli* - грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Традиционная среда ее обитания с кишечник человека, может также высеваться из почвы и воды. Штаммы *E. coli* культивируются на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода. *E. coli* можно культивировать в аэробных и анаэробных условиях, но для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются содержанием в питательной среде растворенного кислорода, для этого в ферментерах создают условия аэрации.

Кроме *E. coli* в МБТ используют множество других микроорганизмов, которые подразделяют на две группы:

микроорганизмы как источники специфических генов (например, ген, кодирующий стабильную ДНК-полимеразу, которая используется в широко применяемой полимеразной цепной реакции - ПЦР; этот ген был выделен из термофильных бактерий и клонирован в *E. coli*).

микроорганизмы, созданные генноинженерными методами для решения определенных задач (например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, генетически модифицированные с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот).

*Saccharomyces cerevisiae* - непатогенные одноклеточные организмы диаметром клетки около 5 мкм. Во многих отношениях представляют эукариотический аналог *E. coli*. *S. cerevisiae* размножаются почкованием, их способность к пре-вращению сахара в этанол и углекислый газ. Издавна использовалась для изготовления напитков и хлеба.

Клетки дрожжей делятся каждые 1,5-2 ч. *S. cerevisiae* является удобной моделью для исследования других эукариот, в т.ч. человека, так как многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Генетическая система дрожжей является неизменным участником всех исследований по изучению ДНК человека.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто подвергают ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения, что необходимо для правильного функционирования белка. Однако *E. coli* и другие прокариоты способны осуществлять эту модификацию, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae* и другие виды дрожжей.

В качестве биологических систем в МБТ используют культуру эукариотических клеток. Кусочек ткани определенного организма (насекомого, растения, млекопитающего) обрабатывают протеолитическими ферментами (трипсином), расщепляющими белки межклеточного материала; при работе с растительными клетками используют ферменты, разрушающие клеточную стенку. Высвободившиеся клетки помещают в питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу, факторы роста. В этих условиях (деление клеток млекопитающих происходит примерно раз в сутки) на стенке емкости с культурой образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, рост прекращается. Обычно удается перенести (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут.

В биотехнологии устойчивые линии используют для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков, для размножения вирусов и выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК

## 1.4 Понятие о первичных и вторичных метаболитах

**Метаболиты** (от греч. Μεταβολίτης, *metabolites*) — продукты метаболизма каких-либо соединений.

Метаболиты бывают первичными, вторичными, промежуточными (подвергающимися дальнейшим биотрансформациям) и конечными, не подвергающимися дальнейшей биотрансформации и выделяемыми из организма с мочой, калом, потом, выдыхаемым воздухом и др.

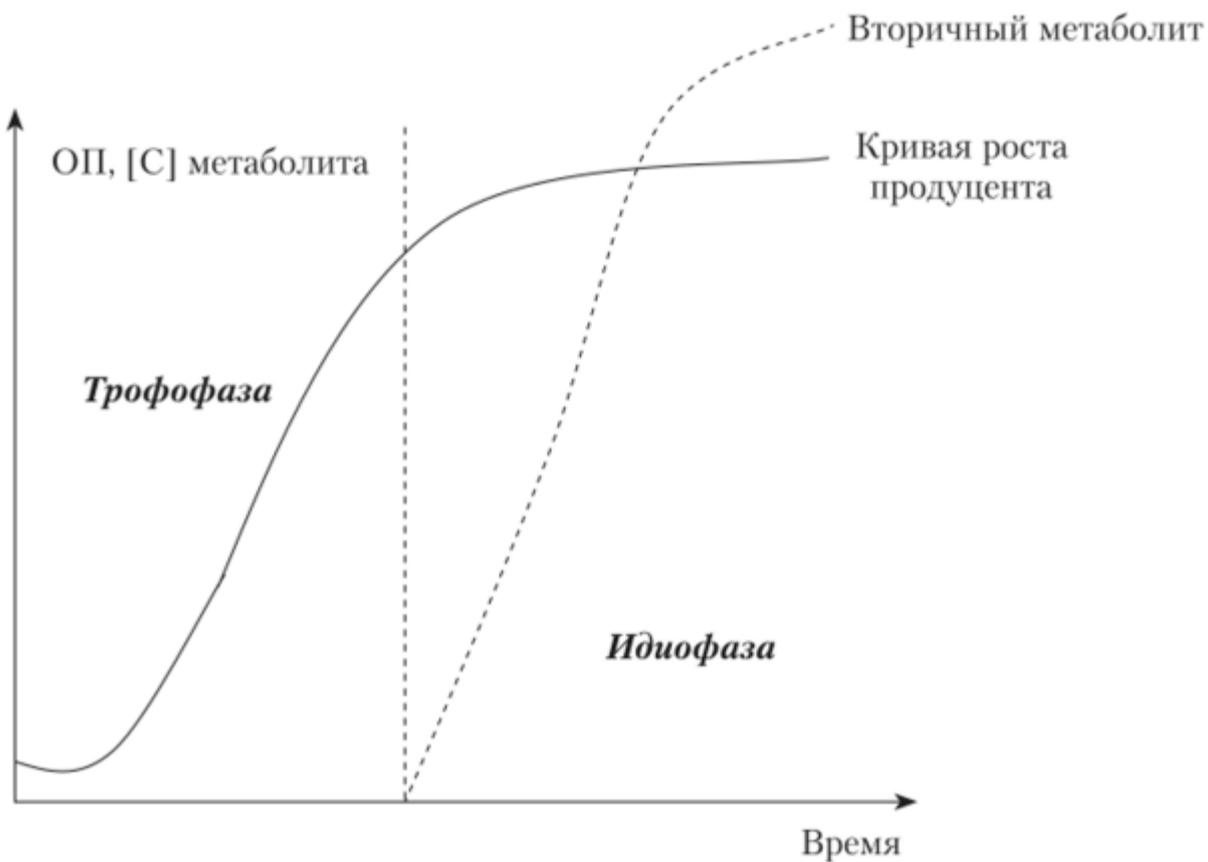
**Первичными метаболитами** называют молекулы, присутствующие во всех клетках организма и необходимые для жизнедеятельности. Они делятся на четыре категории:

- Углеводы
- Белки
- Липиды
- Нуклеиновые кислоты

*Пример:* глюкоза — первичный метаболит, основной и наиболее универсальный источник энергии в организме человека и животных.

**Вторичные метаболиты** — молекулы, встречающиеся не во всех клетках и не у всех видов живых организмов.

Вторичные метаболиты — это вещества микробного (или растительного) происхождения, не существенные для роста и репродукции образующего их организма. Каждый вторичный метаболит производится относительно ограниченным числом видов. Эти соединения синтезируются в конце экспоненциальной или в течение стационарной фаз роста, и их формирование в значительной степени зависит от условий роста, особенно состава питательной среды. В отличие от синтеза первичного метаболита, который происходит одновременно с ростом и размножением культуры, для продуцента вторичных метаболитов (рис. 8.19) принято говорить о трофофазе (когда культура растет и размножается) и идиофазе (когда рост замедляется или останавливается и начинается синтез продукта).



**Рис. 8.19. Рост культуры и образование ею вторичного метаболита**

Механизмы переключения путей метаболизма с первичного на вторичный не ясны. Многие вторичные метаболиты имеют химическую структуру, необычную для биологической материи, однако их образование берет начало от интермедиатов первичного метаболизма (рис. 8.20).

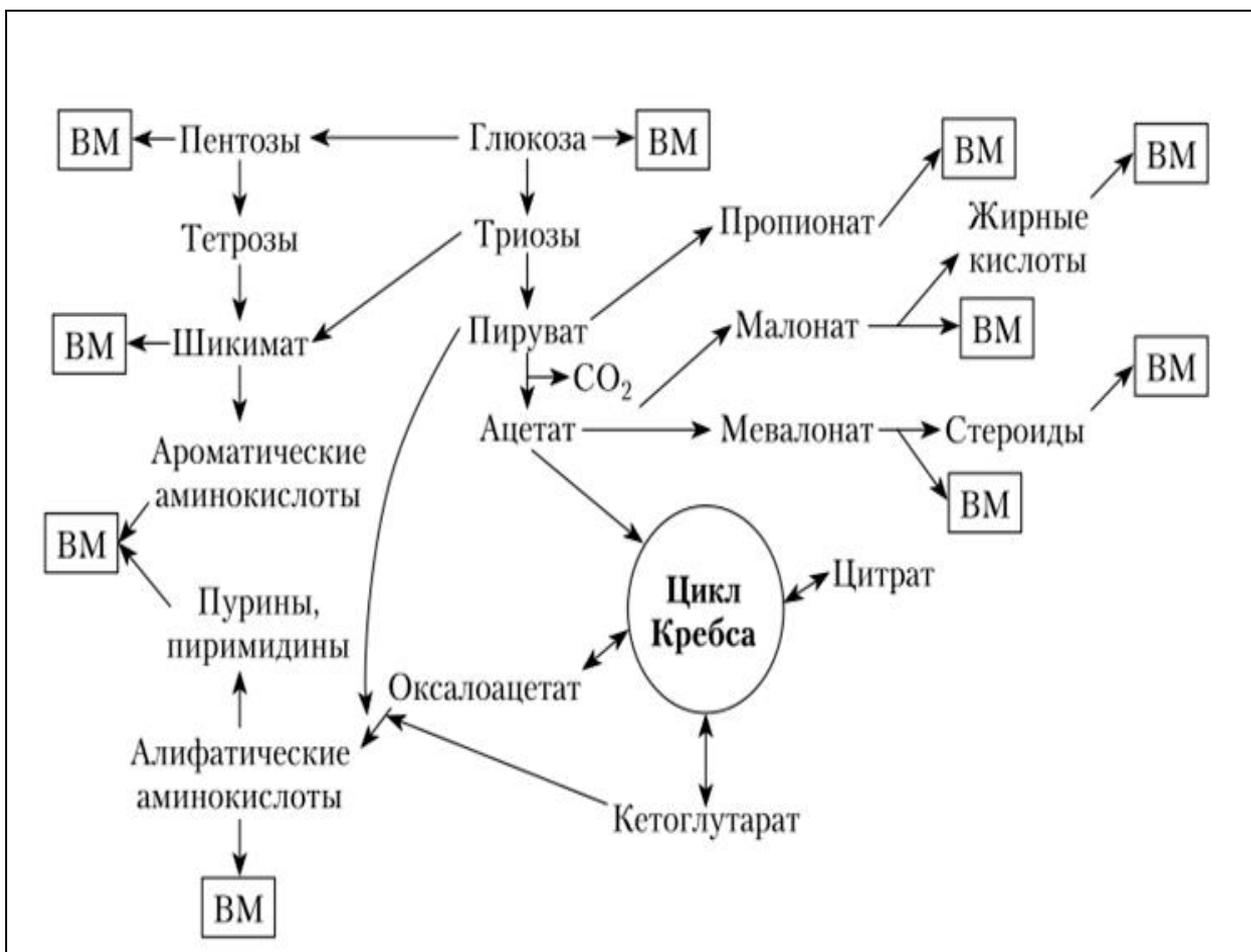


Рис. 8.20. Связь первичного и вторичного метаболизма

Известны четыре класса биосинтетических реакций, «уводящих» интермедиат на путь вторичного метаболизма:

- 1) преобразование первичного метаболита в специфический предшественник;
- 2) реакции модификации или активации;
- 3) полимеризация и конденсация;
- 4) поздние реакции модификации.

К вторичным метаболитам причисляют антибиотики, токсины, иммунодепрессанты и стимуляторы, а также некоторые запасные вещества (поли-Р-алкапоаты). Эти соединения относятся к разнообразным классам органических веществ (аминоциклитолы, кумарины, эпоксиды, нерибосомальные пептиды, полнены, пирролы, терпеноиды, тетрациклины, поликетиды, изопреноиды, стероиды, гиббереллины, фитоалексины и т.д.).

О физиологической роли вторичных метаболитов в жизни собственного продуцента достоверно известно очень мало. Неизвестно, насколько распространен вторичный метаболизм в природе. Само понятие «вторичный метаболит» достаточно расплывчатое, и многие исследователи его не признают.

**Основные объекты биотехнологии.** Перспективные группы биологических агентов: рекомбинанты, термофильные микроорганизмы и ферменты, анаэробные микроорганизмы, ассоциации микроорганизмов, иммобилизованные биологические агенты, вирусы. Сравнительная характеристика биологических агентов, их особенности.

## 1.5 БИОЛОГИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

Важнейшими компонентами биотехнологических процессов, определяющими получение целевого продукта, являются биологические агенты. Номенклатура используемых в биотехнологической практике биологических агентов разнообразна и неуклонно расширяется.

Современные биотехнологические производства базируются на использовании следующих групп биологических агентов:

- клеток микроорганизмов;
- растительные и животные тканевых клеток, клеток тканей человека;
- компонентов клеток (протопластов, мембран, митохондрий, хлоропластов и др.);
- рекомбинантов, полученных методами генетической инженерии;
- внеклеточных продуктов (ферментов, коферментов);
- вирусов.

В производственной практике наиболее широко используется традиционный биологический агент - микробная клетка. Выявляются все новые виды микроорганизмов, которые могут быть использованы в биотехнологии как продуценты полезных веществ. В связи с этим важное значение приобретают специализированные банки биологических агентов, коллекции генетически охарактеризованных микроорганизмов, криобанки клеток тканей животных и растений. Наиболее крупные коллекции промышленных микроорганизмов созданы в США: *Co/i-центр*, *Bacillus-центр*, грибной центр и др. Основная задача коллекции - сохранение жизнеспособности и генетических свойств штаммов. Коллекции культур играют также важную роль в процедуре правовой защиты новых патентуемых штаммов.

С ростом номенклатуры биопродуктов сформировались современные тенденции в использовании микробных клеток, которые связаны с применением термофильных микроорганизмов, анаэробных культур, смешанных культур микроорганизмов и их ассоциаций, иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Термофильные микроорганизмы отличаются высокой конкурентоспособностью, при их культивировании предъявляются менее жесткие требования к уровню стерильности и снижаются затраты на охлаждение ферментационной среды, возможна самопроизвольная дистилляция целевого метаболита (например, при спиртовом брожении).

Возрождается интерес к использованию анаэробных микроорганизмов, которые часто также являются термофилами. Анаэробные процессы привлекают внимание исследователей малыми энергетическими затратами на процесс (нет необходимости в аэрации и интенсивном перемешивании питательной среды), а также возможностью получения в качестве побочного продукта энергоносителя - биогаза или водорода. В связи с этим анаэробные процессы можно относить не только к энергосберегающим, но и к энергопродуцирующим.

Расширяется применение смешанных культур микроорганизмов и их ассоциаций. В природе микроорганизмы существуют в виде сообществ различных популяций, тесно связанных между собой.

Ассоциации культур в сравнении с монокультурами имеют ряд преимуществ:

- способность ассимилировать сложные субстраты, малодоступные для монокультур;
- более высокая продуктивность;
- повышенная устойчивость к токсичным веществам и изменяющимся факторам окружающей среды.

Основная область применения смешанных культур - биodeградация сложных по составу или обладающих токсичностью субстратов. В частности, ассоциации микроорганизмов перспективны в процессах биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов.

Практически все биологические агенты могут быть использованы в биотехнологических процессах в иммобилизованной форме. В природных условиях закрепление микробных клеток на различного вида носителях является естественным и распространенным процессом.

В биотехнологических производствах применяют следующие виды иммобилизации микробных клеток и ферментов:

- включение в гели, капсулы;
- адсорбция на поверхности твердых носителей;
- ковалентное связывание с носителем;
- сшивка бифункциональными реагентами без использования носителя;
- «самоагрегация» интактных клеток при создании определенных условий с образованием хлопьев и гранул.

Создание и использование биосистем с иммобилизованными биологическими агентами - одно из современных направлений развития биотехнологической отрасли, что обусловлено существенными преимуществами иммобилизованных клеток и ферментов перед свободными:

- удержание биоагентов в объеме реактора;
- возможность создания высокой регулируемой концентрации биоагента в реакторе;
- возможность организации непрерывного процесса с многократным использованием агента и высокой скоростью протока среды;
- удешевление процесса выделения целевого продукта из культуральной среды, не содержащей клеточной массы;
- более высокая активность (продуктивность) и стабильность биоагента в иммобилизованном состоянии;
- повышение устойчивости иммобилизованных биоагентов к неблагоприятным факторам среды;
- возможность промышленного использования дорогостоящих биоагентов (например, ферментов);
- использование иммобилизованных биоагентов в создании биологических микроустройств (ферментных электродов, биологических датчиков, запоминающих устройств и т. д.).

Набор биологических агентов непрерывно пополняется новыми, нетрадиционными объектами, появляются нестандартные биотехнологические процессы.

Особое внимание в настоящее время уделяется созданию не существующих в природе биологических агентов методами генетической инженерии. Сформировалось направление конструирования искусственных клеток.

Разрабатываются подходы к созданию искусственных ферментов и аналогов ферментов, обладающих повышенной стабильностью и активностью.

К нетрадиционным биологическим агентам на данном этапе развития биотехнологии относятся растительные и животные тканевые клетки, а также клетки тканей человека.

Биотехнология клеток растений - это молодая отрасль. Культуры растительных клеток могут быть использованы:

- в биосинтетических и биотрансформирующих реакциях;
- для изучения метаболизма растений, а также системы «растение - паразит» (вирусы, грибы, насекомые и т. д.);
- при микроразмножении и получении новых форм растений в агротехнике.

Растительные клетки можно культивировать как на твердой среде, так и глубинным способом. При крупномасштабном культивировании суспензии клеток растений следует учитывать, что эти клетки чрезвычайно чувствительны к эффекту среза и быстро лизируются при интенсивном механическом перемешивании среды (большинство клеток погибает уже к 20-30-му часу культивирования). Клетки растений имеют также тенденцию агрегироваться, что затрудняет контроль параметров процесса и нарушает массообмен.

Получение культуры клеток растений начинают с отбора в асептических условиях кусочка ткани растения. Используют различные ткани любого органа растения (чаще ствол или листья). Ткань помещают в среду, содержащую питательные вещества и факторы роста. Рост происходит в виде каллуса, который в дальнейшем культивируют на твердой среде или используют для получения суспензии клеток. Каллус представляет собой дезорганизованную массу недифференцированных клеток, способных к росту и образованию метаболитов. Ткань каллуса гетерогенна по морфологии и биохимическим свойствам. Для получения суспензионной культуры небольшое количество каллусной ткани помещают в жидкую среду и культивируют на качалке в течение 2-3-х недель. Суспензионная культура более гомогенна и растет быстрее. Часть клеток образует агрегаты различных размеров. Предпочитают в дальнейшем использовать суспензию из отдельных клеток. Время генерации клеток растений составляет в среднем 30-70 ч.

Культуры клеток растений могут быть использованы для биосинтеза вторичных метаболитов (аминокислот, витаминов, гормонов, красителей, липидов, нуклеиновых кислот, полисахаридов, стероидов, ферментов, терпенов, регуляторов роста и т. д.), а также для биотрансформации химических соединений. Однако экономически выгодных биотрансформационных процессов мало. Культивирование клеток осуществляют в условиях асептики. Для получения метаболитов можно использовать иммобилизованные клетки растений.

Важнейшим их преимуществом является повышенная устойчивость к механическим повреждениям.

В настоящее время основными недостатками использования культур тканей растения для получения метаболитов являются:

- высокий уровень инфицирования ферментационной среды;
- низкая скорость роста (время генерации клеток примерно в 100 раз больше, чем у микроорганизмов);
- низкий выход продуктов при большой продолжительности процесса.

В настоящее время культуры клеток растений рассматриваются как биологические агенты для получения дорогостоящих, требующихся в небольшом количестве соединений.

Особый интерес представляет способность культур растений к тотипотенции, т. е. регенерации целого растения из отдельной клетки (в любой клетке растения заложена информация, необходимая для дифференцирования клеток при делении). Это явление используется в агротехнике.

Микроразмножение растений имеет следующие преимущества:

- возможность получения растений, не содержащих возбудителей болезней;
- возможность быстрого размножения (в течение круглого года) медленно растущих растений или новых видов растений;
- однородность рассадочного материала;
- возможность длительного хранения генетического материала и обмена им;
- возможность создания новых генотипов растений.

Новые формы растений создают с использованием приемов клеточной инженерии: гибриды получают с помощью парасексуальной гибридизации путем слияния протопластов. Этот метод отличается тем, что в качестве родительских используются не половые клетки (гаметы), а соматические клетки растения. В большинстве случаев применяют протопласты листа либо протопласты из каллусных тканей. Из гибридных клеток, полученных таким путем, регенерируют целые растения - гибриды.

Традиционный селекционный процесс (основанный на применении полового скрещивания как средства генетического обмена) отличается длительностью (несколько лет), и скрещивание возможно между филогенетически близкими растениями.

Путем слияния протопластов успешно осуществляют гибридизацию при межвидовых, межродовых и даже межсемейственных скрещиваниях. В настоящее время при селекционных центрах создаются лаборатории клеточной инженерии, в которых отрабатывается техника парасексуальной гибридизации.

В промышленных условиях культура клеток растений в виде каллусной ткани применялась при производстве спиртового экстракта биоженьшеня.

Культуры клеток тканей животных и человека используются в следующих основных направлениях:

- производстве вирусных вакцин, изучении действия вирусов и влияния различных факторов на вирусную инфекцию;
- получении физиологически активных веществ, например ин- терферонов;
- трансплантации тканей человека (пересадка клеток поджелудочной железы для больных сахарным диабетом);
- производстве моноклональных антител;
- получении препаратов стволовых клеток для терапевтических целей.

Крупномасштабное культивирование клеток животных и человека осложнено тем, что клетки вне организма растут плохо. Для культивирования клеток используются естественные среды (сыворотка, сгустки плазмы, тканевые экстракты). Созданные синтетические среды (среда Маккоя, среда Игла и др.) имеют сложный состав (более 50 компонентов). Большинство клеток растут на поверхности субстрата в виде монослоя (поверхностно-зависимые клетки). Суспензионный метод культивирования свободных клеток в реакторе требует специальной аппаратуры: конструкция должна обеспечивать интенсивное перемешивание среды без разрушения клеток. В связи с этим разрабатываются суспензионные методы выращивания клеток на носителях. Проблема создания крупномасштабных систем для культивирования клеток животных и человека не решена.

Основой современной промышленной биотехнологии является микробиологический синтез, в котором используются различные группы микроорганизмов для получения широкого ассортимента продуктов (рисунок).

Важнейшими преимуществами микробиологического синтеза являются использование дешевого сырья, часто в виде промышленных отходов, возможность синтеза сложных органических соединений в одну стадию в мягких условиях (низкая температура, невысокое давление).

Эффективность микробиологического синтеза определяется прежде всего возможностями микроорганизмов - продуцентов целевых продуктов.

К промышленным продуцентам предъявляются определенные требования, в числе которых:

- высокая скорость роста;
- непатогенность штаммов, нетоксичность биомассы;
- термотолерантность;
- высокий выход биомассы (или метаболита) от субстрата;
- фагоустойчивость;
- легкость выделения клеток из культуральной жидкости;
- конкурентоспособность, устойчивость в процессе непрерывного культивирования;
- возможность культивирования в нестерильных условиях;
- минимальное накопление второстепенных продуктов метаболизма в культуральной жидкости.

## 1.6. Нанобиотехнология

Биотехнология главным образом известна своим применением в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве, но в последние годы все большее внимание уделяется созданию новых биологических материалов и машин с самыми разнообразными структурами, функциями и назначением. Эта тенденция усилилась с приходом нанотехнологий.

Слово нанотехнология произошло от единицы измерения нанометр (10<sup>-9</sup> метра), составляющей одну тысячную микрометра (микрона), что является приблизительным размером молекулы.

Нанотехнология – изучение, производство и работа со сверхмалыми структурами и приспособлениями возникла благодаря созданию микроскопических приборов.

В настоящее время более 20 тысяч ученых по всему миру проводят исследования в сфере нанотехнологий. Примеры потенциального применения наноматериалов и нанотехнологий дают возможность подсчитать, что в течение ближайших 15 лет они по всему миру позволят создать более 2 млн рабочих мест. Сегодня много молодых компаний работают в направлении развития нанотехнологий. На рынке наноматериалов и их обработки действуют более 50 компаний.

Все их можно можно разделить на шесть категорий: 1) обработка и получение наноматериалов; 2) нанобиотехнология; 3) программное обеспечение; 4) нанофотоника; 5) наноэлектроника; 6) наноприборостроение.

Наиболее многообещающими могут быть исследования компаний в области нанобиотехнологии, наноэлектроники и в создании новых материалов.

Нанобиотехнология – область нанонауки и наноинженерии, применяющей методы и подходы нанотехнологии для создания биоструктур и изучения биологических систем. Нанотехнологи также используют способность биомолекул к самосборке в наноструктуры. Так, например, липиды способны спонтанно объединяться и формировать жидкие кристаллы. Молекулы пептидов в воде формируют правильные нановолокна, которые, в свою очередь, связываются и образуют каркасы.

“ПюраМатрикс” – это коммерчески реализованный каркасный материал из нановолокон, который получил свое название благодаря идеальности в качестве биотехнологически разработанного биологического каркаса. Ученые-биомедики во всем мире сейчас используют его для изучения раковых и стволовых клеток и для воссоздания костной ткани. Наличие в каркасах из нановолокон пор размером от 5 до 200 нанометров и чрезвычайно высокое содержание воды обуславливают возможность их использования при трехмерном выращивании клеток и тканей в восстановительной медицине. Помимо этого благодаря малым размерам пор этих каркасов, очевидно, их можно будет использовать для постепенного выделения медикаментов для пролонгирования их действия. Устройство с нанокаркасом для медленного выделения может имплантироваться в кожу с запасом лекарства на месяцы и даже годы.

ДНК используется не только для создания наноструктур, но и в качестве важного компонента наноустройств. Вполне вероятно, что ДНК, представляющая собой молекулу, хранящую информацию, может стать основным компонентом компьютеров следующего поколения. Вместо того чтобы создавать кремниевую основу микросхемы, нанотехнологи смогут использовать двухцепочечную молекулу ДНК, которая представляет собой натуральный каркас для создания наноструктур, а ее способность к высокоспецифичному связыванию позволяет объединять атомы в предсказуемой последовательности, необходимой для создания наноструктуры. К тому времени, как микропроцессоры и микросхемы превратятся в нанопроцессоры и наносхемы, молекулы ДНК могут заменить используемые в настоящее время неорганические полупроводники. Такие биочипы будут представлять собой ДНК-процессоры, использующие исключительную способность ДНК к хранению информации.

Другие биологические молекулы также используются для создания способов передачи как можно большего количества информации. Например, некоторые исследователи изучают возможность использования поглощающих свет молекул подобных тем, что содержатся в сетчатке глаза, для тысячекратного увеличения объема хранящейся на компакт-дисках информации. Применение нанобиотехнологии будет способствовать развитию экологически чистых производственных процессов.

Исследования по практическому применению нанобиотехнологии в медицине направлены на совершенствование средств и методов диагностики, профилактики и лечения. К ним можно отнести:

– повышение чувствительности и экспрессности анализа, что позволит осуществлять раннюю диагностику заболеваний и уже в ближайшее время может быть использовано для обнаружения онкологических, эндокринных и сердечно-сосудистых заболеваний, вирусных и бактериальных инфекций. Особым типом наноустройств являются биочипы, основанные на применении полимеразной цепной реакции. Они позволяют оценить генетический статус обследуемого пациента и/или патогенного микроорганизма и спланировать мероприятия по профилактике и лечению:

– повышение производительности позволяет проводить комплексное обследование по набору диагностических критериев, что может быть использовано для индивидуального подхода к лечению и профилактике;

– создание биосенсоров путем объединения биологического и электронного компонентов в один миниатюрный прибор;

– разработка молекулярных детекторов на основе нанопор;

– изучение возможности получения и применения эффективных фармпрепаратов и вакцин в виде наночастиц;

– создание на основе наноструктур системы адресной доставки лекарств, позволяющей повысить специфичность и скорость доставки функциональных молекул в клетки-мишени.

Технологии биосистем перспективны с точки зрения контролируемого создания наноустройств различного назначения, таких как получение биосовместимых наноматериалов, конструирование медицинских нанороботов, создание минимальной искусственной биосистемы, способной самостоятельно воспроизводить саму себя и др.

## 1.7 Нанобактерии

В 1981 г. Д. Торелла и Р. Морита описали очень маленькие клетки размером менее 300 нм – ультрамикробактерии. В следующем году М. Мак Донелл и М. Худ обнаружили, что некоторые из них могут проходить через фильтры размером 200 нм.

Термин нанобактерии впервые ввёл Р. Морита в 1988 г., однако “отцом” нанобактерий считается геолог Техасского университета Р. Фольк, который, исследуя горные породы, расположенные вблизи геотермальных источников в окрестностях Рима, в 1989 г. обнаружил подобные структуры в туфе и дал им название «нанобактерии», для того чтобы подчеркнуть их геологическую принадлежность.

Начиная с 1992 г. им была опубликована серия работ по этому вопросу. Несколько лет спустя, в 1996 г. доктор К. Романек из НАСА, исследуя осколок марсианского метеорита, упавшего в Антарктиде, обнаружил в нем структуры, напоминающие нанобактерии. При этом размеры неизвестных частиц составляли около 50 нм. В почвах, осадочных породах и минералах они встречаются в значительных количествах и, очевидно, представляют промежуточную форму жизни между бактериями и вирусами. По мнению ученых, нанобактерии играют важную роль в образовании минералов, превращении вулканических пород в почву и коррозии металлов.

Проявление некоторых патологических состояний почек у человека, в частности образование камней, исследователями из университета города Копио (Финляндия) во главе с О. Кайяндером было объяснено наличием *Nanobacterium sanguineum*. В ходе дальнейших экспериментов финским ученым удалось получить МАт, которые связываются с поверхностными белками нанобактерии, присутствие которых легко определить в любой среде, в том числе и в почечных камнях. С их помощью нанобактерии были найдены в 90 % почечных камней у больных мочекаменной болезнью. После введения нанобактерий кроликам и крысам у них быстро развилась мочекаменная болезнь. В 1998 г. ученые показали, что обнаруженная ими бактерия может реплицироваться в бактериальной среде и имеет ДНК.

Группа американских специалистов из клиники Мейо в Рочестере под руководством доктора Д. Лиски обнаружила в органах некоторых больных людей бактерии, обладающие странными свойствами. Изучая кальцинированные артерии и сердечные клапаны, они обнаружили на их стенках крошечные сферы диаметром 30 – 100 нм.

Как показали исследования, эти наносферы выделяют некоторые аминокислоты, но какие пока неизвестно. Эти частицы способны к самовоспроизведению, хотя способ репликации пока неизвестен.

В табл. 4 нанобактерии сравнены по ряду свойств с другими микроорганизмами – вирусами, прионами и типичными бактериями.

Таким образом, в настоящее время известно, что нанобактерии:

- имеют клеточное строение, включая цитоплазму, в которой выделяются электронноплотные участки и клеточная стенка, похожая на клеточную стенку грамотрицательных бактерий;

- имеют исключительно малый размер, сопоставимый с размером мельчайших вирусов;

- в отличие от вирусов способны размножаться как внутри эукариотических клеток, так и в окружающей среде, в том числе на искусственных питательных средах. Одну из первых выделенных линий удается культивировать в течение 6 лет. Поскольку скорость роста нанобактерий примерно в 10 000 раз меньше, чем скорость роста типичных бактерий, смену среды проводят один раз в месяц;

- содержат нуклеиновую кислоту, структура которой до сих пор не установлена, и небольшой набор специфических белков. Если геном типичных бактерий кодирует несколько тысяч белков, то нанобактерии, по разным данным, содержат всего от нескольких до нескольких десятков белков.

Для объяснения указанных выше особенностей нанобактерий финский исследователь О. Кайяндер и его коллеги выдвинули следующие предположения:

1. Нанобактерии не синтезируют собственные аминокислоты, жирные кислоты (и, возможно, нуклеотиды), а используют готовые, получая их из окружающей среды. При нехватке экзогенных жирных кислот мембранные липиды могут частично заменяться фосфатом кальция.

2. У нанобактерий отсутствуют энергоемкие системы активного транспорта, характерные для про- и эукариотических клеток. Транспорт веществ осуществляется за счет диффузии и броуновского движения, чему способствуют ультрамикроскопические размеры бактерии.

3. Концентрация растворенных веществ и, следовательно, осмотическое давление внутри нанобактерий не отличается от окружающей среды. В связи с этим нанобактериям не требуются энергозатратные системы поддержания внутриклеточного гомеостаза.

Таблица 4

Уникальные свойства нанобактерий в сравнении с вирусами, прионами и типичными бактериями\*

Наличие или отсутствие свойства

Свойства	Нанобактерии	Вирусы	Прионы	Типичные бактерии
Размер, нм	50-300	20-250	<250	>250
Клеточная стенка	Атипичная, фосфат кальция	-, Белково-липидный слой	-	+
Нуклеиновые кислоты	Малое количество, атипичные	+, Атипичные	-	+
Белки	+	+	+	+
Углеводы	+	+	+	+
Саморепликация	+	-	-	+
Рост на DMEM	+	-	-	+
Включение уридина	+	-/+	-	+
Устойчивость к $\gamma$ -излучению, Мрад	$\approx 2,5$	<2,5	>2,5	<0,1->6,0
Устойчивость к температуре кипения воды	+	-/+	+	-
Устойчивость к дезинфектантам	+	-/+	+	-
Устойчивость к антибиотикам	-/+	+	+	-/+
Чувствительность к 5-фторурацилу	+	-/+	-	-/+
Чувствительность к цитозин арабинозиду	+	+	-	Неизвестно
Чувствительность к бисфосфонатам	+	-	-	-
Иммуногенность	+	+	-	+
Способность вызывать воспалительный процесс	+	+	-	+
Содержание липополисахаридов	+	-	-	+ (грам-отриц.)
Способность вызывать гибель клеток	+	+	Специфических	+ Отдельные
Способность вызывать патологическую кальцификацию	+	+ Некоторые	-	+ Некоторые
Образование биопленок	+	-	-	+
Обнаружение в атеросклеротических бляшках	+	+ Отдельные	-	+ Некоторые

+ да; - нет; . \*адаптировано из Kajander E.O. и др. 2003.

Несколько микробиологов уже повторили опыты О. Кайяндера и его коллег и подтвердили существование нанобактерий. Первый из них – Д. Колтон из университета Макгилла в Монреале. Ему удалось выделить медленно растущие нанобактерии, которые одновременно с ростом строили вокруг себя оболочку из кальция. Их белки оказались похожими на белки других бактерий.

Но многие учёные тем не менее сомневаются в том, что нанобактерии действительно являются жизненной формой, и утверждают, что с большей вероятностью это органические структуры, а не биологические. Д. Цисар из Национального института здравоохранения в Бетесде (США) считает, что недостаточно убедительных подтверждений существования нанобактерий и наличия в них ДНК. Расчеты, выполненные Д. Манилоффом из Рочестерского университета (штат Нью-Йорк), показали: для того чтобы содержать ДНК и белки, необходимые клетке для обеспечения функционирования и главной репликации, ее размер должен быть не менее 140 нм. В то же время, по данным разных ученых, большинство нанобактерий имеют диаметр от 30 до 100 нм, т.е. в 10 раз меньший диаметр и в 1000 раз меньший объем, чем типичные бактерии.

Несмотря на то что со времени первого обнаружения бактерий прошло около 20 лет, существование нанобактерий на данное время является одним из спорных научных вопросов, поскольку открытие этой новой формы жизни имеет не только академическое, но и практическое значение. Исследования в данном направлении проводятся во многих лабораториях мира и можно надеяться, что в ближайшее время полученные результаты позволят разрешить возникшие вопросы.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое нанобиотехнология?
2. Каковы перспективы ее применения в диагностике и лечении болезней?
3. История обнаружения нанобактерий.
4. Чем отличаются нанобактерии от типичных (обычных) бактерий, вирусов и прионов?