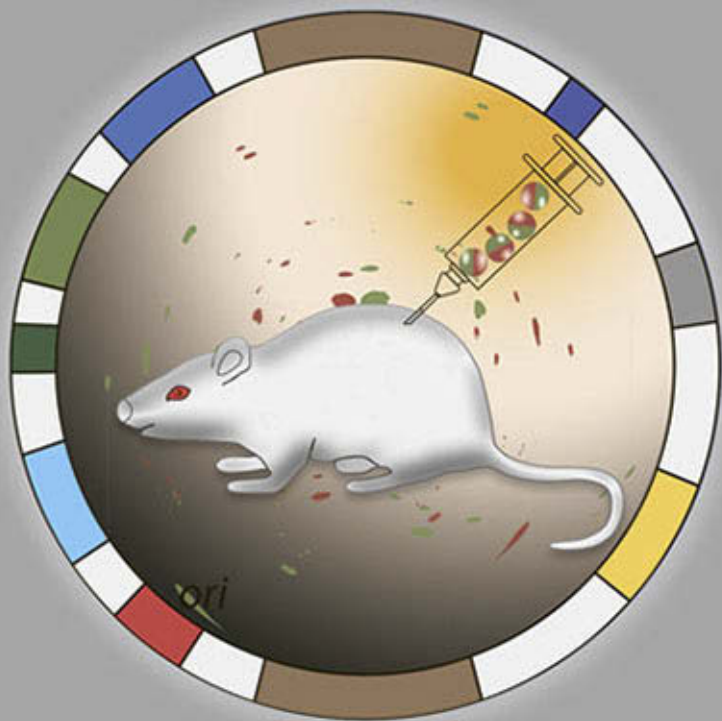


Р. Шмид

НАГЛЯДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ



ИЗДАТЕЛЬСТВО

БИНОМ

НАГЛЯДНАЯ
БИОТЕХНОЛОГИЯ
И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ИНЖЕНЕРИЯ

Rolf D. Schmid

Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik

2. Auflage

143 Farbtafeln von Ruth Hammelehle



WILEY-VCH

Р. Шмид

НАГЛЯДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Перевод с немецкого
А. А. Виноградовой
и канд. биол. наук А. А. Синюшина

под редакцией
канд. хим. наук Т. П. Мосоловой
и канд. биол. наук А. А. Синюшина

2-е издание (электронное)



Москва
БИНОМ. Лаборатория знаний
2015

УДК 577.1
ББК 30.16я2
Ш73

Шмид Р.

Ш73 Наглядная биотехнология и генетическая инженерия [Электронный ресурс] / Р. Шмид ; пер. с нем. — 2-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 327 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10".

ISBN 978-5-9963-2407-1

В справочном издании немецкого автора в наглядной форме изложены основные принципы биотехнологических методов и методов генетической инженерии. Книга построена, как атлас — на каждом развороте помещены иллюстрации для презентации темы и краткий текст, где даны определения, термины и понятия. Несмотря на краткость изложения, наиболее трудные вопросы раскрыты детально и четко. Имеется указатель микроорганизмов.

Для студентов биологических, биолого-химических, химико-технологических, медицинских и фармацевтических вузов, а также научных работников.

УДК 577.1
ББК 30.16я2

Деривативное электронное издание на основе печатного аналога:
Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / Р. Шмид ; пер. с нем. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — 324 с. : ил. — ISBN 978-5-94774-767-6.

В соответствии со ст. 1299 и 1301 ГК РФ при устранении ограничений, установленных техническими средствами защиты авторских прав, правообладатель вправе требовать от нарушителя возмещения убытков или выплаты компенсации

- © Originally published in the German language by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstraße 12, D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany, under the title "Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik". Copyright 2006 by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA All Rights Reserved.
This EBook published under license with the original publisher.
- © Перевод на русский язык, БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014

ISBN 978-5-9963-2407-1

Предисловие

Биотехнология – междисциплинарная область знания, и в XXI в. она займет ключевые позиции в цикле естественных наук.

Биотехнологам необходимо хорошо знать не только биологию, но и молекулярную генетику и цитологию, генетику и молекулярную медицину, вирусологию, микробиологию и биохимию, технологию производства ферментных препаратов и других биотехнологических производственных процессов. С биоинформатикой и системной биологией тесно связаны компьютерные и информационные технологии. Поэтому неудивительно, что до сих пор не существует кратких и содержательных учебных пособий по биотехнологии, которые охватывали бы эту дисциплину во всем ее многообразии. По каждому из разделов этой книги, например разведение животных и растений, биоинформатика, читатель может найти более полную информацию в специальных, часто многотомных изданиях.

Как показывает мой собственный опыт и многолетний опыт преподавания студентам, новый материал интересно иметь перед собой как целостную картину; это и мотивирует на дальнейшее изучение тысяч деталей, на первый взгляд кажущихся несвязанными.

Предлагаемая читателю книга как раз и есть такое нужное целостное руководство и одновременно это детализированный подробный справочник. Достаточно познакомиться с оглавлением (пивоварение, этиловый спирт, рекомбинантные вакцины, геном человека, протеомика и др.). Каждая тема представлена кратким текстом и понятными иллюстрациями. Для каждой темы приведены ссылки на оригинальную литературу – главы из научных монографий и научные статьи. Принятый в книге подход к подаче материала связан с неизбежным риском чрезмерно кратко изложения, но дает возможность осветить основные положения и продемонстрировать взаимосвязи между разными темами.

Я надеюсь, что мне удалось хотя бы отчасти достичь поставленной цели. Читатель получил исчерпывающий путеводитель в науку биотехнологию для того, чтобы не только ориентироваться в лабиринте терминологии, полной англицизмов, но и, хочется думать, увлечься этой наукой. Большой вклад в подготовку представленного в книге материала внесла Рут Хаммелеле. Она подготовила логически построенные и эстетически выдержанные схемы, придавшие достаточно краткому тексту «второе измерение».

Выходу этой книги в свет, безусловно, весьма способствовали редакторы Барбара Фрундер, Утте Рольфс и Карин Дембовски, которых я рад сердечно поблагодарить за более чем добросовестное исполнение своих обязанностей и очень ценные замечания.

Я выражаю персональную благодарность своим коллегам, которые просматривали материал целых тем или отдельных разделов этой книги и внесли существенные замечания и исправления. Среди них: Макс Рёр (Вена), Франк Эмде (Бонн), Мария-Регина Кула и Герман Зам (Юлих), Ан-Пинг Ценг (Брауншвейг), Фолькер Каше (Гамбург–Гарбург), Петер Дюрре (Ульм), Ульф Шталь, Эдельтрауд Маст-Герлах и Дитрих Кнорр (Берлин), Удо Грефе (Йена), Гюнтер Шмидт-Кастнер (Вупперталь), Карл-Хейнц Маурер (Дюссельдорф), Вольфганг Барц и Александр Штайнбюхель (Мюнстер), Фридер Шеллер (Потсдам), Бертольд Хок и Вольфганг Людвиг (Вайенштефан), Рейнхард Кремер (Кёльн), Томас фон Шелль, Ханс-Иоахим Кнакмус, Карл-Генрих Энгессер, Йорг Метцгер, Петер Шойрих, Ульрих Эйзель, Матиас Ройс, Петер Штадлер, Клаус Маух, Кристоф Зилдатк, Михель Тумм и Йозеф Альтенбухнер (Штутгарт), Гельмут Гельдерман, Рольф Клаус, Герд Вебер и Рольф Блайх (Штутгарт–Хохенхайм), Гельмут Улих (Брейзах), Иоахим Зидель, Клаус Валериус, Антон Хазельбек и Ульрих Бейрендт (Пенцберг), Вольфганг Войлленбен и Клаус Шульдт (Тюбинген), Рольф Вернер (Биберах), Виланд Вольф и Андреас Лоренц (Лаупхайм), Франк-Андреас Гункель (Вупперталь), Михель Брёкер (Марбург), Бернхард Гауэр, Вольфганг Пресслер и Дитер Иан (Людвигсхафен), Дитер Мангольд и Юлия Шулер (Маннхайм), Франк Цохер и Пауль Хаберманн (Хёхст), Тильманн Шпеллиг (Бергкамен), Дитер Остерхельт, Фридрих Лоттшпайх и Бернд Генсбахер (Мюнхен). В заключение хочу поблагодарить сотрудников института, в котором я работаю, за терпение и понимание, проявленные при ответах на мои бесконечные вопросы; это – Ютта Шмитт, Изабелла Кауфман, Маркус Энцильбергер, Тиль Бахманн и Юрген Плайс.

Я был бы удивлен, если несмотря на многостороннюю помощь при написании этой книги, в ней не осталось неясностей и ошибок. Я прошу благосклонных читателей связываться непосредственно со мной при желании высказать свои замечания, указать на неточности и ошибки. Моя электронная почта www.itb.uni-stuttgart.de/taschenatlas. При переиздании этой книги я постараюсь учесть все замечания и по возможности улучшить книгу.

Штутгарт, декабрь 2001

Рольф Д. Шмид

Предисловие ко 2-му изданию

За пять лет, которые прошли с момента выхода в свет первого издания биотехнология и методы генетической инженерии стремительно развивались. Валовый продукт биоинженерных производств постоянно увеличивается и теперь уже превышает суммарный продукт традиционных производств, основанных на ферментации. За это время объем производства L-глутаминовой кислоты удвоился, достигнув 1,5 млн тонн в год, что связано не только с изменившимися вкусовыми предпочтениями населения, но и с тем, что на мировой рынок вышел Китай. Последовательности многих геномов пока не расшифрованы, хотя для более десяти растений и животных и сотен микроорганизмов они уже известны. Геномный анализ привел к новым открытиям — например, к пониманию роли малых интерферирующих РНК (siRNA). В сочетании с протеомикой и метаболомикой геномный анализ позволил изучать процессы жизнедеятельности организмов в рамках подхода системной биологии. В настоящее время расшифровка генома любого человека оценивается в ~1500 евро. Благодаря геномному анализу стали понятны причины возникновения многих заболеваний, а также процессы старения и нарушения обмена веществ. В медицине уже применяются генетические методы персональной диагностики и генная терапия, на основе анализа генома могут быть сделаны даже рекомендации по питанию.

В последние годы промышленная биотехнология развивается на фоне роста цен на нефть и продолжающейся активной индустриализации нашей планеты.

Увеличение температуры атмосферы вызывает тревогу общества, и для сохранения «космического корабля» под названием «Земля» требуются новые альтернативные источники энергии, а также новые технологии. Биозтанол и «биодизель» получают из растительного сырья, их используют как топливо. Подобные «белые» биотехнологии имеют большое будущее.

При подготовке второго издания материал книги был полностью переработан и дополнен. Во 2-е издание включены четыре новых раздела: тканевая инженерия, РНК, системная биология и «белая» биотехнология.

Хочу искренне поблагодарить за предоставление ценных материалов о производственных разработках биотехнологов Ваандера Ритхорста (Sandoz), Бернарда Хауэра и Уве Пресслера (BASF), Андреаса Лойхтенбергера (Degussa) и Карлхайнца Маурера (Henkel). За информацию об академических исследованиях я особенно благодарен Сюзане Грэбли (Йена), Сибилле Туде (Штутгарт), Вольфгангу Войллебену (Тюбинген), Матиасу Ройсу, Клаусу Пфиценмайеру и Клаусу Мауху (Штутгарт).

Кроме того, я признателен Рут Хамелеле и Бернарду Вальтеру (Firma erpline, Kirchheim o.T.) за превосходный графический и полиграфический дизайн, а также д-ру Роми Кирстен за поддержку со стороны издательства.

Штутгарт, осень 2005
Рольф Д. Шмид

Введение

Настоящая книга, построенная, как атлас, предназначена для тех студентов, изучающих биологию, биохимию и биотехнологию, которые хотят получить первые представления о всем многообразии современной биотехнологии. Модули текста и иллюстраций, указатель* и список литературы – все это должно помочь читателю в углубленном изучении предмета. В 143 цветных иллюстрациях содержится информация по различным аспектам биотехнологии и методам генетической инженерии, а сопутствующий текст дополняет и поясняет эти сведения. Для того чтобы облегчить поиск, на поля вынесены заголовки основных тем.

Книга начинается с краткого исторического обзора. Так как биотехнология имеет прикладное (коммерческое) значение, читатель найдет в книге некоторые рыночные показатели. Изложение начинается с разделов, посвященных биотехнологии пищевых продуктов, спиртов, кислот и аминокислот, а затем уже антибиотиков, специальных продуктов, ферментов и, наконец, пекарских и кормовых дрожжей. Описанием очистки сточных вод начинается раздел «Биотехнология и окружающая среда». Затем следует большой раздел «Биотехнология в медицине», в котором изложены сведения о получаемых методами

генетической инженерии препаратах, новейших способах получения эмбриональных и стволовых клеток из эмбрионов и зрелых организмов, возможностях рекомбинантных антител и применении биосенсоров. В следующем большом разделе – «Биотехнология в сельском хозяйстве», описываются современные методы селекции животных и растений.

Вторая половина книги посвящена научным основам биотехнологии и биотехнических методов. Там вы найдете раздел «Основы микробиологии», затем «Основы биотехнологических методов», а также «Молекулярно-генетические методы».

Наконец, следует очень интересный раздел «Тенденции развития», где рассмотрены, например, исследования в области протеомики, системной биологии и «белой» биотехнологии.

В последних разделах обсуждаются вопросы безопасности, этики и экономические аспекты.

Для дальнейшего изучения предлагается обширная литература, сгруппированная в соответствии с основными разделами книги. Помимо этого, имеются ссылки на веб-сайты.

Мне остается лишь пожелать читателям с удовольствием приступить к изучению этой увлекательной области науки и добиться в этом успеха.

* В русском издании имеется указатель микроорганизмов.

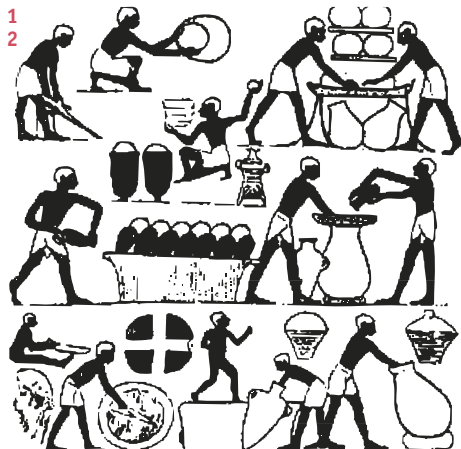
Этапы развития биотехнологии

ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА. Наука, которую мы с вами называем биотехнологией, ведет свою историю с глубокой древности. Вероятно, первыми биотехнологическими открытиями были наблюдения о том, что продукты питания сохраняются продолжительное время в высушенном, засоленном или засахаренном виде, а также о специфическом «божественном» действии сброженных фруктовых соков. По дошедшим до нас древним документам, зарождение городов сопровождалось развитием различных ремесел по хлебопечению, пивоварению, виноделию и сыроварению, а также по выделке кожи. Монастыри Западной Европы в средние века были центрами ремесленничества, поэтому именно там происходило усовершенствование биотехнологических процессов (в частности, виноделия, хлебопечения и пивоварения). Появление крепкого пива вызвало некоторые отступления от строгой жизни по религиозным канонам, поскольку во время поста разрешалось пить пиво. Современная биотехнология берет свое начало с конца XIX в., и на развитие науки очень сильно повлияли Первая и Вторая мировые войны: ученые активно занимались разработкой новых антибиотиков и способов производства растворителей (что было продиктовано военными нуждами). Современная биотехнология обязана своими успехами в основном открытиям в биохимии, генетике и клеточной биологии, разработке методов генетической инженерии (1970-е гг.), а также появлению новых направлений, в частности биоинформатики и протеомики. Наблюдаемые темпы развития биотехнологической науки позволяют предположить, что она станет «наукой нового тысячелетия».

ПИОНЕРЫ БИОТЕХНОЛОГИИ. Биотехнология – прикладная наука, и многие биотехнологические задачи имеют важное экономическое значение. Французский химик Луи Пастер в 1864 г. доказал, что брожение вызывают микроорганизмы. Чтобы наблюдать за этим процессом, он использовал микроскоп. Предложенные Пастером методы получения чистых культур микроорганизмов и стерилизации питательных сред (пастеризация) заложили основы прикладной микробиологии. Первыми успехами в исследованиях и разработке методов борьбы с патогенными микроорганизмами мы также обязаны Пастеру и его научной школе. В начале XX в. немецкий химик Отто Рём и японский ученый Йокиши Такаmine предложили использовать для технологических целей ферменты, полученные из отходов мясной промышленности или из культуральной жидкости после культивирования плесневых грибов. Открытие Рёма позволило значительно усовершенствовать процесс выделки кожи (до этого времени в качестве источника ферментов использовали экскременты собак). Введение методов,

разработанных Такаmine, ознаменовало переход на новый уровень в технологии производства крахмала и солода. Успехи биотехнологии впервые получили признание широкой общественности в 1900 г., когда стало очевидным преимущество биотехнологической очистки воды в борьбе с распространением эпидемий. В период Первой мировой войны был сделан целый ряд важнейших открытий. В Германии Карл Нейберг разработал метод получения глицерина из дрожжей; Хаим Вейцман, эмигрировавший из России в Англию, предложил способ производства ацетона, основанный на анаэробной ферментации бактериями рода *Clostridium*. Ацетон и глицерин служили сырьем при получении взрывчатых веществ (нитроглицерина и кордита), поэтому усовершенствование их производства в военное время имело особенно важное значение. Способ Нейберга и Вейцмана получил широкую известность и по сути стал основой ферментативных технологий. Символическим признанием заслуг Вейцмана стало его избрание первым президентом созданного в соответствии с декларацией А.Д. Бальфура в 1948 г. государства Израиль. В послевоенные годы технология производства ацетона с помощью клеток *Clostridium* не потеряла своей актуальности; для растворения лака стали широко применять побочный продукт ферментативной реакции 1-бутанол. В 1922 г. Александр Флеминг случайно обнаружил антибактериальное действие пенициллина. Хуард Уолтер Флори выделил это вещество и впервые применил в медицине. Вторая мировая война способствовала активному поиску и промышленному производству антибиотиков, и к 1950 г. их число превысило 1000. Антибиотики очень широко используются в медицине, в животноводстве и растениеводстве. С 1950 г. благодаря техническим достижениям появилась аналитическая биотехнология: ферменты и антитела стали применяться для высокочувствительного анализа пищевых продуктов и медицинской диагностики. В последние 30 лет в связи с надвигающимся нефтяным кризисом и ввиду неуклонно растущего населения Земли особый интерес вызывает получение из биомассы таких энергоносителей, как этанол и метанол.

Биотехнология – древняя наука



- 1 Пивоварение
- 2 Хлебопечение
- 3 Выделка кожи

Древность	Сбраживание соков с получением этанола Получение кисломолочных продуктов и дрожжевого теста Выделка кожи с использованием экскрементов собак
1650	«Орлеанский» способ получения уксусной кислоты
Ок. 1680	Антоний Левенгук впервые наблюдал бактериальные клетки в оптический (световой) микроскоп
1867	Луи Пастер разделил культуры пивных дрожжей и уксуснокислых бактерий
Ок. 1890	Луи Пастер и Роберт Кох разработали первые вакцины
1900	Йокише Такамина использовал α -амилазу в технологических целях
1908	Отто Рём применил животные протеиназы для получения стирального порошка
1916	Хаим Вейцман разработал ферментативный метод получения бутанола и ацетона
С 1920	Получение лимонной кислоты путем ферментативного процесса с помощью <i>Aspergillus niger</i>
1928/29	Александр Флеминг открыл антибактериальное действие пенициллина
1943	Зельман Ваксман выделил стрептомицин
С 1949	Микробная трансформация стероидов в промышленных масштабах
С 1957	Получение глутаминовой кислоты ферментацией с <i>Corynebacterium glutamicum</i>
С 1960	Микробные протеиназы добавляют в стиральные порошки
С 1965	Применение микробного реннина в сыроварении
С 1970	Полученный ферментативными методами «сироп с повышенным содержанием фруктозы» заменяет сахар в производстве безалкогольных напитков
1972/73	Стэнли Козн и Герберт Бойер разработали стратегию переноса генов с помощью плазмидных векторов
1975	Цезарь Мильштейн и Георг Келлер получили моноклональные антитела с использованием гибрида
С 1977	Производство рекомбинантных белков в бактериальных клетках
1982	Получены первые трансгенные растения, устойчивые к гербицидам, и трансгенные животные (нокаутные линии мышей)
1985	Кэри Муллис разработал метод быстрой амплификации ДНК – метод ПЦР
С 1990	Начало реализации проекта «Геном человека»
1995	Трансгенные томаты разрешены к свободной продаже в США и Великобритании
С 1995	Попытки генной терапии на человеке
1996	Установлена нуклеотидная последовательность генома пекарских дрожжей
1996	Родилась овечка Долли – первое клонированное млекопитающее
1998	В базах данных содержится информация о последовательностях различных ДНК общим размером 2 млрд п.н.
1999	Геном дрозофилы размером 1,6 млрд п.н. полностью прочитан за четыре месяца
1999	Получена культура клеток человека
1999	Годовой объем мирового рынка рекомбинантных белков для фармакологии превысил 10 млрд долл. США
2001	Опубликована расшифрованная последовательность генома человека длиной более 3 млрд п.н.

Биотехнология сегодня

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И КЛЕТочНАЯ БИОЛОГИЯ. В 1973 г. Стэнли Коэну и Герберту Бойеру в Сан-Франциско удалось впервые ввести чужеродный ген в бактериальную клетку и осуществить его экспрессию. Спустя всего лишь 10 лет первый медицинский препарат, полученный методами генетической инженерии, был допущен к применению, а в настоящее время число таких препаратов уже превысило несколько десятков. Среди них такие важные лекарственные препараты, как инсулин (применяют при сахарном диабете), эритропоэтин (при малокровии), фактор VIII (при заболеваниях крови) и β -интерферон (при рассеянном склерозе). Сотни других препаратов находятся на стадиях разработки и клинических испытаний. В последнее время методы генетической инженерии находят применение не только в медицине, но и в сельском хозяйстве. Так, в странах Северной Америки широкое распространение получили трансгенные растения, обладающие повышенной устойчивостью к насекомым или к действию гербицидов. Современные генно-инженерные технологии позволяют получать растения с улучшенными пищевыми показателями или со специфическими декоративными характеристиками, а также создавать сорта древесины, обладающие новыми свойствами. В химической промышленности все большее значение приобретает биокатализ – использование микроорганизмов или ферментов для осуществления стадий химического синтеза. Центральным направлением современной генетической инженерии, несомненно, является исследование генома. К настоящему времени удалось секвенировать геномы более 200 микроорганизмов и некоторых высших животных, в том числе человека. Полученная информация используется при разработке новых лекарств, а также при изучении молекулярных основ сложных болезней с помощью функционального анализа генома (протеомика). Методы генной терапии позволяют осуществлять замену поврежденных генов, являющихся причиной заболевания, на «здоровые». Разработки в этой области подкрепляются исследованиями в клеточной биологии, которая также стремительно развивается в последнее время.

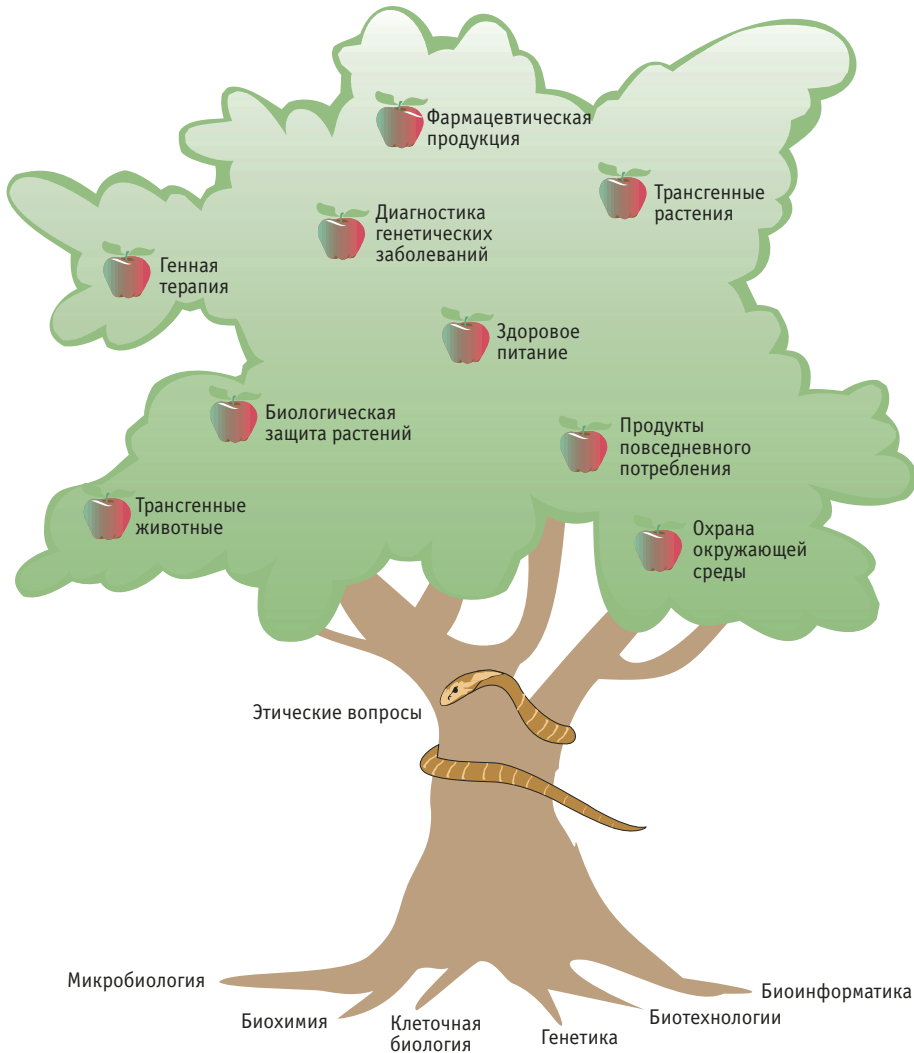
ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ. Овца Долли, родившаяся в 1996 г., – первое клонированное млекопитающее, генетически полностью идентичное своей биологической матери. Ее появление вызвало бурную общественную реакцию, особенно в связи с фантастическими темпами развития эмбриологии в последние десятилетия. На какой стадии эмбрион может считаться человеком? Каково наше отношение к клонированию человека? Что такое болезнь с точки зрения индивидуума и общества? Как меняется возрастная структура популяции в связи с успехами генной тера-

пии? Насколько приемлемы генетические методы усовершенствования растений и животных в соответствии с нашими экономическими потребностями и изменившимися условиями окружающей среды? Какими должны быть экономические отношения между развивающимися и индустриально развитыми странами в период расцвета биотехнологии? Каковы экологические последствия вмешательства человека в биологическое разнообразие видов на Земле? Ответы на эти и многие другие этические вопросы еще не найдены. Возможность расширения функциональных способностей человека – лишь вопрос времени, и вскоре этическая сторона биотехнологии также станет предметом дискуссии.

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ. Многие современные фармацевтические препараты представляют собой рекомбинантные белки или созданы с применением методов генетической инженерии. Знание структуры генома человека и принципов его функционирования играет все большую роль в медицинской диагностике. Методы генетической инженерии получают все более широкое распространение в животноводстве, растениеводстве, а также в пищевой промышленности. Объем рынка продукции генетических технологий составляет около 30 млрд долларов США (2004 г.) и продолжает стремительно увеличиваться. Эти данные относятся только к традиционной продукции, получаемой путем ферментации без учета производства алкогольных напитков.

Направления современной биотехнологии

- Здоровье • Пища
 Экологически чистые технологии • Рациональное ведение сельского хозяйства



Рынок некоторых продуктов биотехнологии (на 2004 г.)

	Объем производства, т	Объем мирового рынка, евро	Рыночная цена, евро/кг
Пиво	155 000 000	450 млрд	2,50
Этанол	35 000 000	9 млрд	0,25
Глутаминовая кислота	1 500 000	1 500 млн	1,00
Лимонная кислота	1 200 000	1 200 млн	1,00
Протеазы для стиральных порошков	1 000	300 млн	3,00
Цефалоспорины	–	9 млрд	–
Аспартам	30 000	150 млн	5,00
Тетрациклины	4 500	900 млн	20,00
Инсулин	8	1 млрд	125,00
Эритропоэтин	0,025	10 млрд	400 000,00

Алкогольные напитки

ВВЕДЕНИЕ. Напитки, содержащие этиловый спирт, в той или иной мере распространены во всех мировых культурах. В Западной Европе это пиво, вино, сброженные фруктовые соки и игристые вина, а в странах Азии это, прежде всего, рисовая водка саке. Во многих регионах существуют традиции получения своеобразных, характерных только для этой местности напитков, в которых в разных концентрациях содержится этанол: в Средней Азии это кумыс, получаемый из молока кобыл, в Восточной Европе – квас, на Ближнем Востоке – пиво на основе проса, а в странах Южной Америки – пиво, получаемое путем сбраживания сока агавы.

ВИНО. Вино получают путем сбраживания виноградного сока с помощью дрожжей. На вкусовые качества вина (букет) оказывают влияние множество факторов, среди которых наиболее важными являются сорт винограда, условия его выращивания, погодные условия, при которых производится сбор винограда и, конечно, технология приготовления вина. Виноделие включает несколько стадий. Первая стадия – это подготовка: сбор винограда, его дробление и прессование, то есть получение сока, последующая переработка (различна для красного и белого вина) и сбраживание сока с образованием молодого вина. Вторая стадия – обработка вина, его выдерживание и розлив. В процессе дробления и прессования ягоды освобождаются от косточек и кожицы (мезги). В случае белых вин мезгу быстро отделяют от сусла, а при традиционной технологии переработки по «красному способу» без разделения выдерживают при температуре 20 °С для того, чтобы антоцианы, содержащиеся в кожице ягод, перешли в сок. В современном производстве применяют и другие способы извлечения красящих веществ из мезги: например, нагревание до 40–50 °С или добавление пектиназ к мезге приводит к быстрому высвобождению антоцианов в раствор. Высококачественные (сортовые) вина изготавливают, как правило, из одного сорта винограда, однако допускается смешивание сусла, полученного из различных сортов (купажные вина); в неурожайные годы это вызвано необходимостью. В зависимости от технологии к полученному суслу добавляют сахар, кислоты, небольшие количества СаСО₃ для нейтрализации кислоты и также небольшие количества SO₂ или пиросульфита калия (этап сульфитирования). Эти добавки улучшают вкусовые качества вина, предотвращают рост нежелательных аэробных микроорганизмов (таких как уксуснокислые бактерии или плесневые грибы) при брожении, препятствуют окислению натуральных красящих веществ и ароматизаторов и ингибируют феноксидазу – фермент, в результате действия которого вино при сбраживании приобретает коричневый цвет. Традиционно брожение проводили в деревянных бочках, однако в современном производстве чаще используют резервуары из полимерных материалов или высококачественной стали. Брожение может происходить с участием диких штаммов дрожжей, содержащихся в кожице

винограда, или при помощи культуры чистых винных дрожжей определенного штамма (*Saccharomyces cerevisiae* или *S. ellipsoideus*). Продолжительность брожения составляет от нескольких дней до нескольких месяцев в зависимости от состава сусла и температуры ферментации. При изготовлении сухих вин сахар сбраживается полностью, а полусладких и сладких вин – брожение прерывают искусственно. При необходимости продлить процесс брожения, в среду культивирования добавляют сусло, предварительно законсервированное обработкой СО₂ под давлением 8 бар. Вина различают по содержанию сахара и спирта. Сухие вина содержат не более 9 г сахара/л, полусухие – не более 18 г/л, а десертные вина – свыше 18 г/л. Содержание спирта в вине также определяет его принадлежность к тому или иному сорту: если вино готовят без внесения в сусло добавок, содержание спирта в нем не может быть выше 12% об.; в крепленые вина добавляют этиловый спирт (более 12% об.). Молодое вино выдерживают. Совокупность химических, биологических и физических процессов, которые протекают при выдерживании вина, способствует созреванию его вкуса; при этом необходимо, чтобы рН > 3,2 – такие условия благоприятствуют росту молочнокислых бактерий, которые в ходе малатно-лактозной ферментации превращают яблочную кислоту в значительно более слабую молочную кислоту и СО₂.

ИГРИСТЫЕ ВИНА получают из столовых (натуральных) вин. В вино добавляют 1–3% сахарозы и дрожжи. Сбраживание, осуществляемое в бутылках или закрытых резервуарах, протекает с образованием этанола и СО₂. При температуре 20 °С избыточное давление в бутылках с готовым игристым вином должно составлять не менее 3 бар.

КРЕПКИЕ СПИРТНЫЕ НАПИТКИ с содержанием спирта 30–60% получают в результате сбраживания сахаросодержащих экстрактов зерна, корнеплодов и фруктов и последующей дистилляции. Сырьем для бренди и коньяков служит виноград, для корна и виски – кукуруза, водки – картофель, текилы – сок агавы и т.д.

РИСОВАЯ ВОДКА (САКЭ). Производство рисовой водки в большей мере напоминает пивоварение, чем виноделие, так как сбраживаемым углеводом является крахмал, однако в отличие от производства пива процесс ферментации при получении саке осуществляется в анаэробных условиях. Сваренный на пару рис размельчают и смешивают со спорами гриба *Aspergillus oryzae*; в результате инкубации в течение нескольких дней при высокой влажности и температуре 30 °С происходит частичный гидролиз крахмала под действием ферментов гриба. Продукт (*коджи*) смешивают с распаренным рисом и засевают штаммом дрожжей (*мото*). Брожение продолжается в течение 20 дней при 25 °С, и к концу ферментации саке содержит не менее 20% спирта. Перед продажей концентрацию спирта доводят до 16% по объему, напиток фильтруют и пастеризуют.

Алкогольные напитки

Пиво	При прорастании зерен ячменя содержащийся в них крахмал гидролизуется под действием ферментов, затем полученные сахара сбраживают дрожжами
Вино	Сбраживание виноградного сока дрожжами
Игристое вино (шампанское)	Дополнительное сбраживание вина, к которому добавляют сахар и дрожжи
Сидр	Сбраживание яблочного сока дрожжами
Саке	Крахмал, содержащийся в зернах риса, гидролизуется под действием ферментов гриба <i>Aspergillus oryzae</i> , а затем полученные сахара сбраживают дрожжами
Виски	Экстракты из ячменя, пшеницы, ржи или кукурузы сбраживаются, а затем подвергаются дистилляции
Водка	Экстракт картофеля или пшеницы сбраживается, а затем подвергается дистилляции

Объем мирового рынка алкогольных напитков

Пиво		Вино		Саке	
Всего произведено в 2004 г.	1 550 млн гектолитров	Всего произведено в 2002 г.	261 млн гектолитров	Япония (2004)	8,4 млн гектолитров
Из них:		Из них:			
Китай	277 млн	Франция	53 млн		
США	238 млн	Италия	51 млн		
Германия	105 млн	Испания	31 млн		
Бразилия	90 млн	США	20 млн		
Япония	70 млн	Аргентина	16 млн		
Великобритания	58 млн	Австралия	10 млн		
Россия	838 млн	Германия	9 млн		

Общая схема производства пива, вина и саке

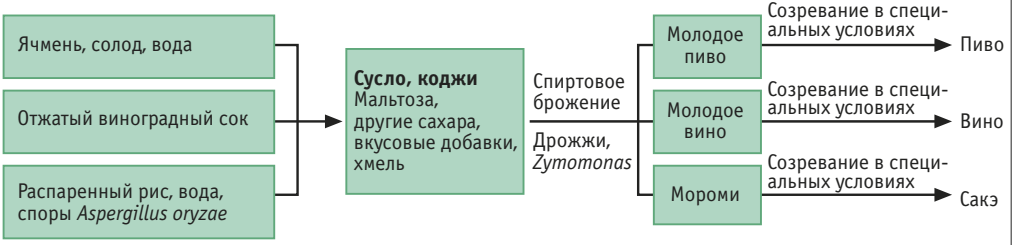
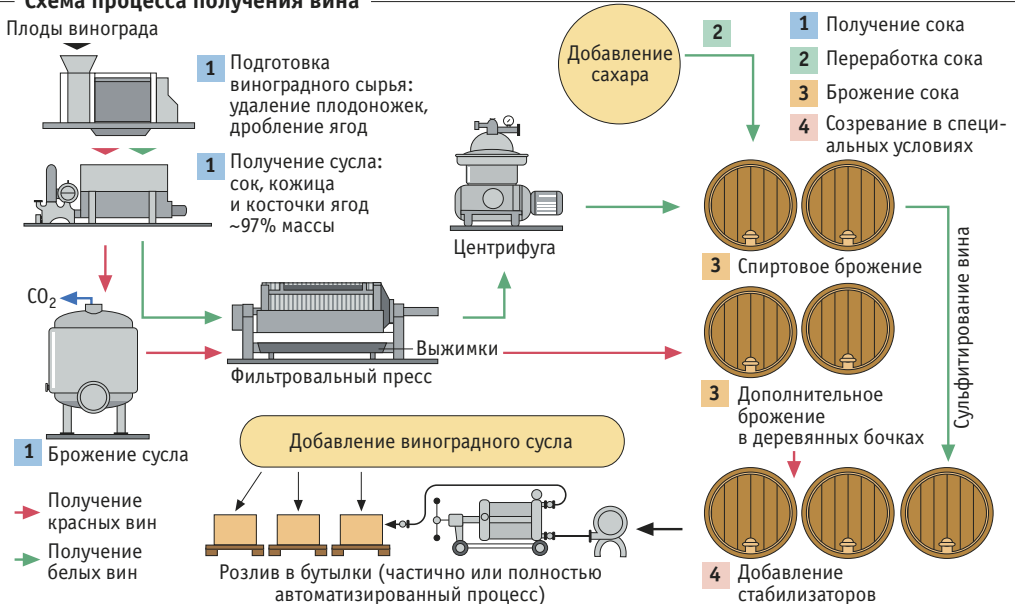


Схема процесса получения вина



Пивоварение

ВВЕДЕНИЕ. Пиво – один из самых древних алкогольных напитков; в наши дни пиво не утратило своей популярности. Его получают из ячменного сусла с помощью пивных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Объем мирового производства пива в 2004 г. достиг 1,6 млрд гектолитров (160 млн тонн). Основные страны-производители пива – Китай, США и Германия. В Германии с 1516 г. закон разрешал использовать в пивоварении только ячменный солод, хмель, воду и дрожжи, а для пшеничного пива – пшеничный солод. В других странах в качестве источника крахмала и ферментов наравне с ячменем и пшеницей служат и другие зерновые культуры (например, просо или сорго), а также допустимы некоторые добавки, в том числе ферменты. Современная технология пивоварения позволяет получать легкое пиво со сниженным содержанием алкоголя, а также безалкогольные сорта. В Германии на долю таких сортов приходится около 3% объема производства.

ПРОИЗВОДСТВО ПИВА. Прежде всего получают солод. Для этого ячмень инкубируют в определенных условиях до прорастания зерна. На этой (первой) стадии происходит активация ферментов; пророщенное зерно сушат. Затем солод затирают – нагревают и выдерживают при строго определенной температуре: при этом происходит частичный гидролиз белков и углеводов, катализируемый ферментами. Полученный водный экстракт, называемый пивным суслом, кипятят около 2 часов, добавляя в него хмель, который придает пиву характерный горьковатый вкус, а содержащиеся в хмеле дубильные вещества служат в качестве консервирующих агентов и облегчают фильтрацию. При кипячении пивное сусло в значительной степени концентрируется, затем в пивное сусло вносят клетки определенного штамма дрожжей и культивируют сначала в аэробных, а затем в анаэробных условиях в течение нескольких дней. Дрожжи превращают сахара в спирт и углекислый газ. В зависимости от выбранной технологии в конце ферментации содержание спирта составляет 2–18% объема суслу. Для окончательного созревания пиво выдерживают при температуре около 0 °С от нескольких дней до нескольких недель. При этом осаждаются вещества, вызывающие помутнение пива, а неприятный привкус, обусловленный образованием диацетила, исчезает в результате разложения диацетила на ацетон и 2,3-бутандиол. Использование на дальнейших стадиях различных добавок, в том числе ферментов, значительно влияет на вкусовые качества пива. После фильтрации пиво, предназначенное для продажи на экспорт, пастеризуют.

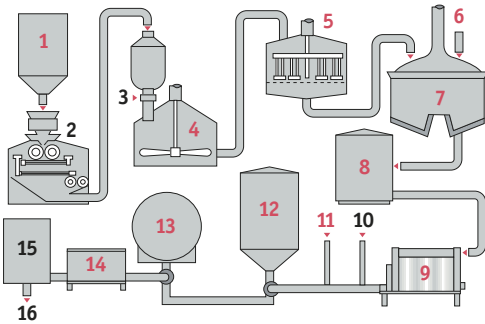
СОРТА ПИВА. Известно несколько вариантов классификации сортов пива: в зависимости от использованной культуры дрожжей выделяют сорта низового (лагер, пилзнер) и верхового брожения (вайс, альт, кельш, портер, эль и стаут). По исходному содержанию суслу,

то есть «экстрактивности начального суслу» разделяют сорта с содержанием более 16%, 11–14%, 7–8% и 2–5,5%. Сорта пива различаются а) по составу сырья и степени очистки конечного продукта; б) по используемым дрожжевым культурам: либо это дрожжи, осуществляющие «верховое» брожение, которые в процессе ферментации остаются во взвешенном состоянии и не сбраживают дисахарид мелибиозу, либо дрожжи, осуществляющие «низовое» брожение, которые оседают на дно и обладают способностью сбраживать мелибиозу; в) по режиму ферментации (время и температура) и последующего выдерживания.

ПИВО С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ АЛКОГОЛЯ И БЕЗАЛКОГОЛЬНОЕ ПИВО. Для производства таких сортов пива разработаны два технологических подхода: 1) экстрактивность начального суслу составляет 7–8%, и процесс сбраживания останавливают, когда содержание алкоголя достигнет 0,5%; 2) из обычного пива с экстрактивностью начального суслу 12–13% удаляют спирт путем вакуумного выпаривания или специального фильтрования. В настоящее время ведется разработка биореактора с иммобилизованными дрожжевыми клетками, в котором процесс останавливается автоматически при содержании алкоголя 0,5%.

НОВОЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ ПИВОВАРЕНИЯ. Современная биотехнология пивоварения развивается по следующим направлениям: а) получение трансгенного ячменя с ферментами, обладающими улучшенными свойствами, например с термостабильной β -глюканазой; б) применение молочнокислых бактерий в качестве стартовой культуры для сбраживания солода с целью предотвратить заражение солода грибами рода *Fusarium* и другими микроорганизмами; в) сокращение времени выдерживания пива, необходимого для разложения диацетилов, посредством добавления бактериальной α -ацетоллактатдекарбоксилазы – фермента, который переводит α -ацетоллактат непосредственно в ацетат, минуя стадию образования диацетиллов; г) использование рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae*, синтезирующих α -ацетоллактатдекарбоксилазу или амилазы. При ферментации, осуществляемой такими штаммами, становится возможным получать сорта пива с низким содержанием углеводов. Технологический процесс пивоварения также непрерывно совершенствуется: так, продолжительный этап созревания пива, необходимый для приобретения им специфических вкусовых качеств, в современном производстве заменен кратковременным нагреванием до 90 °С и последующим созреванием в биореакторе с иммобилизованными дрожжевыми клетками на протяжении всего двух часов.

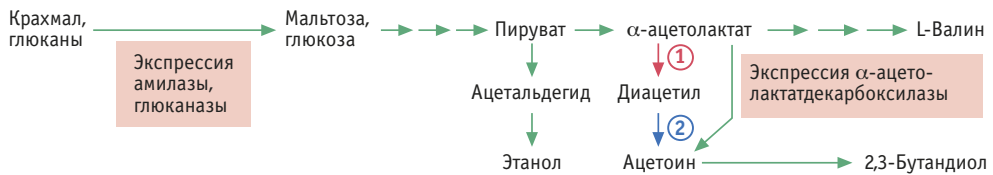
Схема процесса пивоварения



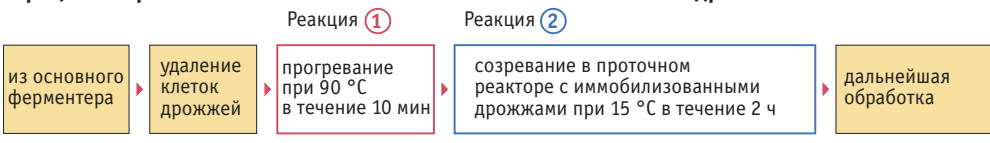
- | | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| 1 Солод | 10 Воздух |
| 2 Мельница
грубого помола | 11 Дрожжи |
| 3 Вода | 12 Резервуар
для брожения |
| 4 Затиране солода | 13 Резервуар
для хранения |
| 5 Очистка | 14 Фильтр |
| 6 Хмель | 15 Резервуар
под давлением |
| 7 Кипячение сусл | 16 Розлив |
| 8 Гидроциклонный чан | |
| 9 Пластинчатые
теплообменники | |

Стадия	Процедура	Условия/особенности
1	Соложение	Проращивание зерен ячменя
	Высушивание солода	Сушка проросших зерен
	Удаление ростков	Отшелушивание ростков
4	Затиране солода	Повторная активация ферментов солода, гидролиз крахмала
5	Фильтрация	Удаление высокомолекулярных веществ
6, 7	Кипячение сусл с хмелем	Добавление веществ, определяющих специфический аромат пива
8	Осветление сусл	Вращение сусл
9	Охлаждение сусл	Охлаждение
11	Внесение культуры дрожжей	Инокуляция
12	Основное брожение с образованием молодого пива	Брожение
		Удаление клеток дрожжей
13	Дозревание	
14	Фильтрация, пастеризация	

Рекомбинантные штаммы дрожжей



Процесс созревания пива с использованием иммобилизованных дрожжей



Ферментация в пищевой промышленности

ВВЕДЕНИЕ. Процессы ферментации с использованием микроорганизмов нашли широкое применение в производстве пищевых продуктов. Реакции, осуществляемые микроорганизмами, используются при консервировании, pH среды понижается в результате молочнокислого брожения (в квашеной капусте), после частичного гидролиза в присутствии микроорганизмов (хлебная закваска, колбасные изделия, темпех) продукты лучше усваиваются организмом, для улучшения вкуса (кисломолочные продукты), а также для получения соусов (соевый соус, мисо из риса). В развитых странах примерно треть всех продуктов питания получают путем ферментации, осуществляемой определенными штаммами микроорганизмов.

СТАРТОВЫЕ КУЛЬТУРЫ. В пищевой промышленности используются самые разнообразные микроорганизмы. Они служат в качестве стартовых культур при приготовлении кисломолочных продуктов, различных сортов хлеба (закваски), выпечки (лекарские дрожжи), в пивоварении (пивные дрожжи) и виноделии. Стартовая культура может содержать только один штамм микроорганизмов, различные микроорганизмы одного вида и смешанные культуры. Наиболее важным критерием качества культуры является высокая скорость ферментации и получение желаемого продукта, например обладающего устойчивостью к антибиотикам или фаговой инфекции. Объем рынка стартовых культур в мире составляет сотни миллионов долларов США.

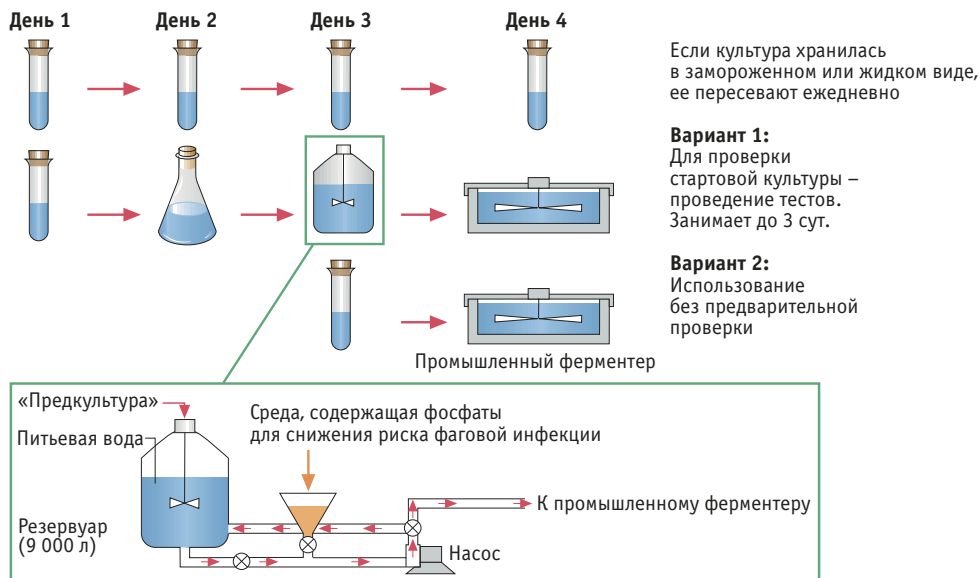
ПРОИЗВОДСТВО КОЛБАС. Сырокопченые колбасы (они могут храниться вне холодильной камеры) готовят со стартовой культурой стафилококковых бактерий (*Staphylococcus carnosus*) и лактобактерий, а также бактерий рода *Penicillium*. Гликоген мышечной ткани перерабатывается микроорганизмами с образованием молочной кислоты, это позволяет снизить уровень pH ниже 5 и предотвратить рост многих других микроорганизмов. В кислой среде белок мышечной ткани (изоэлектрическая точка 5,3) переходит в желеобразное состояние. Продукты ферментативных превращений жиров и белков обеспечивают специфический вкус колбасного изделия. При изготовлении соленых колбас (поваренная соль, нитраты и нитриты в качестве консервантов) используют стафилококковые бактерии или лактобактерии, устойчивые к повышенному содержанию соли.

СЫРОВАРЕНИЕ. В 1994 г. мировое производство сыра достигло 14,6 млн т в год, при этом около 6 млн т сыра было произведено в странах Европейского союза (ЕС). В Европе производится более 1000 сортов сыра. Чтобы приготовить сыр, молоко сбраживают, добавляя в него сычужный фермент или рекомбинантный химозин. Спровоцированная стартовыми культурами фер-

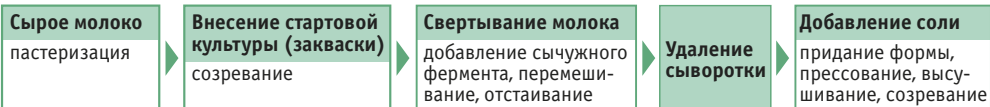
ментация приводит к образованию молочнокислого сгустка, из которого вызревает сыр. В производстве сыров используют самые разные микроорганизмы, чаще всего *Penicillium* (камамбер, рокфор), *Streptococcus* (эмменталь) и *Lactococcus* (гарцер). Разнообразие сортов сыра объясняется различным происхождением молока (коровье, козье или овечье), технологией производства (аэробные, анаэробные или смешанные условия роста бактериальной культуры), а также методами введения стартовых культур (поверхностное нанесение или внутреннее впрыскивание).

КАКИЕ ПРОДУКТЫ ПОЛУЧАЮТ ПУТЕМ ФЕРМЕНТАЦИИ НЕ В ЕВРОПЕЙСКИХ СТРАНАХ. В китайской кухне традиционно используется так называемый красный рис (ang-kak). Его получают, добавляя к влажному рису споры *Monascus purpureus*. Благодаря антимикробным свойствам красный рис получил широкое распространение в качестве приправы, его также применяют при нарушениях пищеварения. В восточной кухне готовят кишк (kishk), для этого набухшие зерна пшеницы подвергают ферментации бактериями, обитающими в кислом молоке. Японская приправа мисо получается в результате добавления к пропаренному рису грибов *Aspergillus oryzae*. По очень древнему рецепту китайской кухни до сих пор готовят соевый соус — белковый гидролизат, обладающий сильным ароматом. Для этого в смесь соевой муки и пшеничных отрубей впрыскивают культуры грибов *Aspergillus oryzae*; в условиях повышенной влажности при температуре 35 °C образуется поверхностная культура. После добавления равного объема водного раствора соли смесь подвергают ферментации молочнокислыми бактериями или дрожжами в течение года при комнатной температуре. Путем ферментации соевых бобов или пропаренного риса под действием грибов *Rhizopus oligosporus* готовят темпех (tempeh) — основную пищу населения Индонезии и Малайзии.

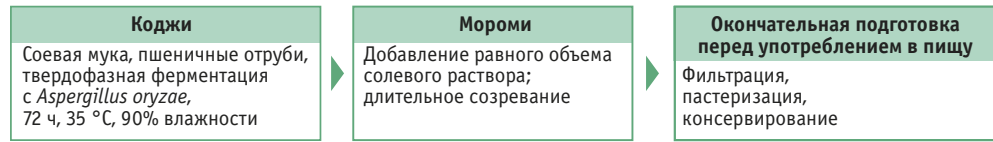
Получение стартовых культур



Производство сыра



Производство соевого соуса



Традиционные продукты, получаемые путем ферментации в незападноевропейских странах

Продукт	Страна	Использование	Сырье	Микроорганизмы
Коджи (Koji)	Япония	Предшественник соевого соуса и мисо	Соя, пшеница, распаренный рис	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus sojae</i>
Шойю (соевый соус)	Япония	Темные соусы	Коджи	<i>Pediococcus sp.</i>
Мисо (соевая паста)	Япония	Светлые соусы	Коджи	<i>Aspergillus</i> Молочнокислые бактерии
Тофу (Tofu), суфу (Sufu)	Япония, Китай	Коагулированный белок	Соевые бобы, соевое молоко	<i>Mucor sufu</i> и др.
Натто (Natto)	Япония	Острые соусы	Распаренные в еловой хвое соевые бобы	<i>Bacillus natto</i>
Темпех (Tempeh)	Индонезия	Гарниры	Вареные соевые бобы в банановых листьях	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Анг-как (Ang-kak)	Индонезия, Китай	Приправы, пищевой краситель, в терапии желудочно-кишечных расстройств	Распаренный рис	<i>Monascus purpureus</i>
Гари (Gari)	Нигерия	Гарниры	Маниок	<i>Geotrichum</i> , <i>Corynebacterium</i>

Пищевые продукты и молочнокислое брожение

ВВЕДЕНИЕ. История использования человеком процессов молочнокислого брожения молока (кисломолочные продукты), овощей (квашеная капуста) и кормов для скота (силос) насчитывает сотни, а для некоторых процессов и тысячи лет. Луи Пастер, впервые выделивший молочнокислые бактерии в 1856 г., заложил основы для понимания биохимии этого важного процесса. Продукты, получаемые в результате молочнокислого брожения, обладают хорошими вкусовыми качествами и долго хранятся, так как снижение pH, происходящее в процессе брожения, препятствует развитию других микроорганизмов.

МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ. Группа молочнокислых бактерий весьма гетерогенна по морфологии клеток, однако физиология ее представителей описана достаточно однозначно: все молочнокислые бактерии окрашиваются по методу Грама и являются облигатными аэробами, т. е. они не синтезируют гемсодержащие белки (каталазы), однако могут расти в присутствии кислорода. Молочнокислые бактерии расщепляют лактозу до глюкозы и галактозы, а затем превращают их в лактат. При «гомoferментативном» молочнокислом брожении (также называемом гликолизом), которое осуществляют *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus casei* и *Lactococcus lactis*, из 1 моль глюкозы образуется 2 моль лактата, а при «гетероферментативном» брожении, осуществляемом *Leuconostoc mesenteroides* и *Lactobacillus brevis*, — только 1 моль лактата. От наличия лактатрацемазы в клетках бактерий зависит образуется ли L-(+)-молочная кислота (обычно выход 50–90%), D-(–)-молочная кислота или их рацемат. Физиологическую ценность кисломолочных продуктов трудно переоценить: в них нет лактозы и они содержат белки, уже подвергшиеся мягкому гидролизу.

КИСЛОМОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ. Среди кисломолочных продуктов в Европе наиболее распространены простокваша, сметана, йогурт, кефир и пахта (< 1% жира). Эти продукты получают при бактериальном заражении сырого молока в естественных условиях хранения. В йогурте содержание L-(+)-молочной кислоты более 95%. Этот продукт производят, используя *Lactobacillus acidophilus* или облигатно анаэробный штамм *L. bifidus*, обнаруженный в кишечной флоре грудных младенцев. Йогурты особенно хорошо усваиваются организмом и оказывают стимулирующее действие на иммунную систему.

В результате реакций, осуществляемых бактериальными протеазами и липазами, кисломолочные продукты приобретают своеобразный вкус. Наиболее важными микроорганизмами для производства молочных продуктов являются стрептококки, лактобактерии, *Leuconostoc* и дрожжи.

ЗАКВАШИВАНИЕ ОВОЩЕЙ И ОВОЩНЫХ СОКОВ.

В Германии особой популярностью пользуются квашеная капуста и соленые огурцы (заготавливаются и реализуются через торговую сеть около 200 000 т в год). Для заквашивания обычно используют белокочанную капусту, которую помещают в бочки вместимостью до 100 т. Как правило, процесс брожения осуществляется разнообразными микроорганизмами (бактериями, дрожжами и грибами) в результате спонтанного заражения, однако в некоторых случаях брожение инициируют добавлением закваски (стартовых культур). В качестве других примеров использования в пищу овощей, подвергшихся молочнокислому брожению, можно привести квашеную свеклу (Польша и Россия) и кимчи (кислая китайская капуста или редька, Корея). Овощные соки, подвергшиеся ферментации молочнокислыми бактериями, особенно богаты витаминами и минеральными веществами, хорошо усваиваются организмом и хранятся продолжительное время (например, морковный и томатный соки).

ЗАКВАСКА. В отличие от пшеничной муки, используемой для приготовления дрожжевого теста, ржаная мука закисает при pH < 4,3; это позволяет получать своеобразную корочку при выпекании хлеба из ржаной муки. В закваске для теста при pH 4,2 наряду с молочнокислыми бактериями содержатся дрожжи.

СИЛОСОВАНИЕ — распространенный способ заготовки сочных кормов, в частности, кормовой свеклы. Силосную культуру измельчают, а затем помещают в специальные хранилища с ограниченным доступом воздуха. В таких условиях осуществляется процесс молочнокислого брожения. Если молочная кислота образуется в недостаточных количествах, силос может оказаться зараженным маслянокислыми бактериями, в том числе представителями клостридий. В этом случае бактерии могут попасть в молоко коров, которые питались зараженным силосом. Как правило, в силосе присутствует психотрофный патоген *Listeria monocytogenes*, который в случае несоблюдения правил пастеризации может активно размножаться на пищевых продуктах (в мягких сырах, мясном фарше и зеленом салате) при длительном хранении в холодильнике.

Молочнокислое брожение

Бактерии, осуществляющие гомоферментативное молочнокислое брожение

Lactococcus lactis
Streptococcus pyogenes
Lactobacillus delbrueckii
L. helveticus

L. salivarius
L. casei
и др.

Бактерии, осуществляющие гетероферментативное молочнокислое брожение

Leuconostoc mesenteroides
Leuconostoc lactis
Lactobacillus brevis
и др.

Гомоферментативное брожение

2 молекулы
лактата
 $2 \times C_3$

Гликолиз

Лактоза

Глюкоза
 C_6

Пентозофосфатный путь

Гетероферментативное брожение

Лактат
 C_3

Ацетат/этанол
 C_2

CO_2
 C_1

Кислое тесто

	Пшеница	Рожь
Доля мировой территории, занятой под злаковые культуры (%)	33	< 3
Основной тип теста	Дрожжевое тесто	Кислое тесто
Вещество, удерживающее газы при выпекании	Клейковина (глютен)	Пентозан, белки после закисания теста
Плотность хлеба (объем/масса)	3,5	2,0



Квашеная капуста, йогурт и силос

Квашеная капуста

Нарезанная
белокачанная
капуста

2–2,5%
поваренной
соли

Спонтанное закисание

Анаэробная ферментация в бочках
объемом до 100 т, 18–20 °C

При концентрации молочной кислоты
> 1,5% отфильтровывают, пастеризуют
и готовят к продаже

Йогурт

Молоко

Гомогенизированное, пастеризованное;
возможны добавки, например кусочки фруктов

Термостатный способ

Добавление
стартовых культур*,
расфасовка для
продажи, инкубация,
охлаждение до 4 °C

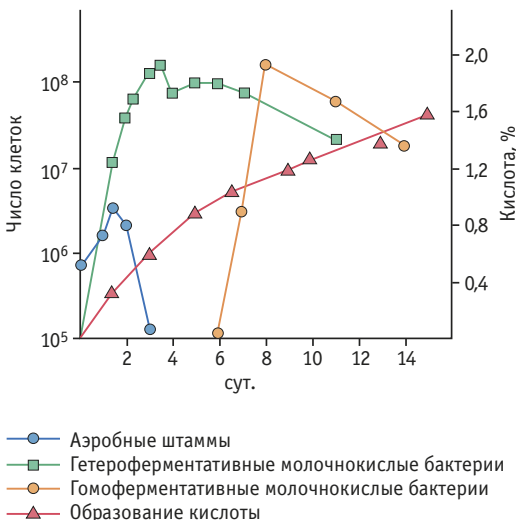
Резервуарный способ

Заполнение больших
резервуаров, добавле-
ние стартовых культур*,
инкубация, охлаждение
до 4 °C, расфасовка
для продажи

* Например, *Lactobacillus bulgaricus*,
L. acidophilus, *Streptococcus thermophilus*

Силос

Рост популяции бактерий и образование кислоты
в процессе ферментации



Этиловый спирт

ВВЕДЕНИЕ. Этиловый спирт (этанол) используется как сырьё в химическом производстве, как растворитель, а также как топливо. В 2004 г. мировое производство этанола составило 45 млрд л (34,6 млн т), из которых лишь 2,3 млрд л были получены из этилена – продукта переработки нефти и природного газа. Более двух третей этанола, поступающего на рынок, получают из глюкозы биотехнологическими методами с помощью анаэробных дрожжей и бактерий. Традиционная технология производства этанола использовалась во многих странах, затем стало экономически выгоднее получать этанол из продуктов переработки нефти. В последние годы в связи со значительным ростом мировых цен на нефть все чаще обращают внимание на биотехнологические подходы как резервную стратегию. Брожение может снова стать основным способом промышленного получения этанола лишь при условии очень низких цен на биомассу или слишком высоких цен на энергоносители. С 1975 г. в Бразилии и США этанол используют в качестве топлива для двигателей внутреннего сгорания.

МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСИНТЕЗ. Для получения этанола путем спиртового брожения самое важное значение имеют пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. При гликолизе 1 моль D-глюкозы дает 2 моль этанола. В бактериях *Zymomonas mobilis*, выделенных из сока агавы, этанол образуется в кетодезоксифосфоглюконатном пути (пути Энтнера–Дудорова). Оба этих микроорганизма не имеют ферментов для расщепления полисахаридов, поэтому перед тем, как добавлять в питательную среду углеводы, их расщепляют до моносахаридов подходящими ферментами. Другой биотехнологический метод получения этанола основан на применении рекомбинантных штаммов-суперпродуцентов, которые в результате клонирования новых генов приобретают способность перерабатывать такие дешевые виды сырья, как крахмал, целлюлоза или гемицеллюлоза. Особый интерес представляют термофильные анаэробные бактерии *Thermoanaerobacter ethanolicus*, которые могут расщеплять многие углеводы. Оптимальные условия для роста этого микроорганизма – температура 69 °С, рН среды 4,5–9,5.

ПЕРЕРАБОТКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТАЦИИ. В основе промышленной технологии получения этанола лежит процесс брожения, который осуществляется в биореакторах объемом до 500 м³ в периодическом режиме. В стандартных асептических условиях клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* менее подвержены заражению молочнокислыми бактериями, чем *Zymomonas mobilis*. В качестве бактериальной культуры используют дрожжи, выращенные на обогащенной сахарами среде. Через 14–20 ч выход этанола достигает максимума (~90% теоретического значения). Процесс образования этанола замедляется из-за подавления роста

клеток дрожжей катаболитами. При концентрации глюкозы >0,1%, поэтому в промышленном процессе этанола применяют специальные методы контроля концентрации глюкозы в среде («fed-batch»). Другой причиной замедления роста дрожжей может быть высокая концентрация этанола, поэтому из культуральной среды следует непрерывно удалять этанол (через 72 ч его концентрация достигает ≥8% об.) путем азеотропной перегонки. При этом получают 95%-й этанол, который годится в качестве топлива. Абсолютный (100%) этанол получают путем специальных методов дистилляции, фильтрации через молекулярные или мембранные фильтры. При повторном использовании культуры время ферментации сокращается, например, по методу *Мелле-Войно* дрожжевые клетки концентрируют центрифугированием, полученной суспензией засевают другой биореактор. Промышленная технология может быть усовершенствована, если будет разработана непрерывная технология брожения. Теоретически такой процесс возможен, однако его практическое воплощение связано с преодолением больших технических проблем. Перспективно использование иммобилизованных дрожжевых и бактериальных клеток.

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ. Основным сырьем для производства этанола являются меласса из сахарной свеклы (Бразилия) или кукурузный крахмал (США). В мире насчитывается более 700 крупных фирм, производящих этанол путем ферментации в периодическом режиме. С 1975 г. в Бразилии осуществляется масштабное производство этилового спирта из мелассы по простой технологии (периодическая ферментация, дистилляция). Эту технологию применяют более 100 крупных производителей этанола; в настоящее время производство этилового спирта в Бразилии достигло 12 млрд л в год. В США с 1975 г. на некоторых автозаправочных станциях продают автомобильное топливо – смесь этанола (9:1; так называемый «газохол»). В США производство этанола с использованием осахаренного кукурузного крахмала в качестве питательной среды для роста дрожжей осуществляется с применением более сложных технологий (ферментация в периодическом режиме, мембранная очистка) и достигло 10,6 млрд л в год (2003). В Бразилии и в США отходы промышленного получения этанола используются как кормовые добавки. В Японии разработана экономичная технология с несколькими вариантами непрерывного технологического процесса, где применяются иммобилизованные клетки дрожжей. В экспериментальной установке, работающей в непрерывном режиме, за 200 суток был получен 10%-й этанол, который очищали на мембранных фильтрах.

Этанол



M_R 46,07

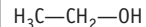
$D.$ 0,79367 (15 °C)

$T_{кип}$ 78,32 °C

Код CAS* 64-17-5

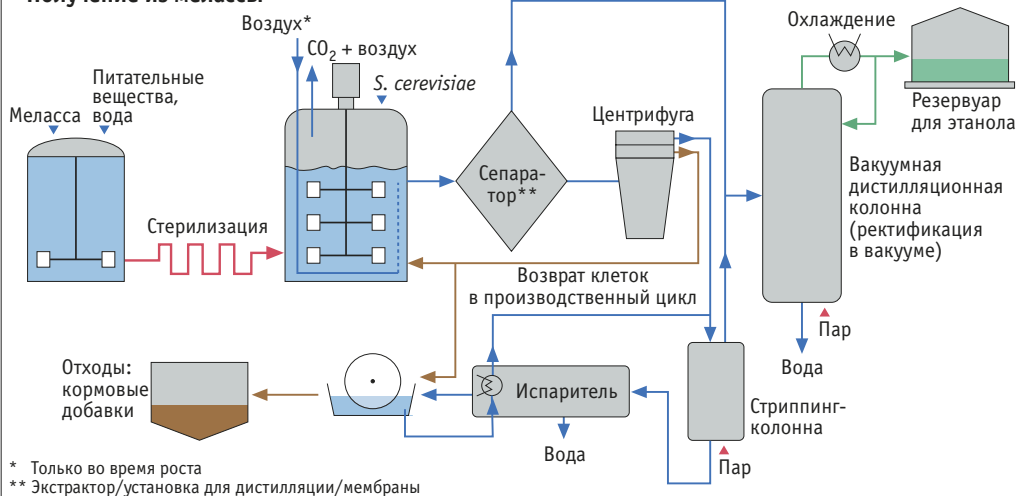
Промышленное получение:

в основном гидратацией этилена

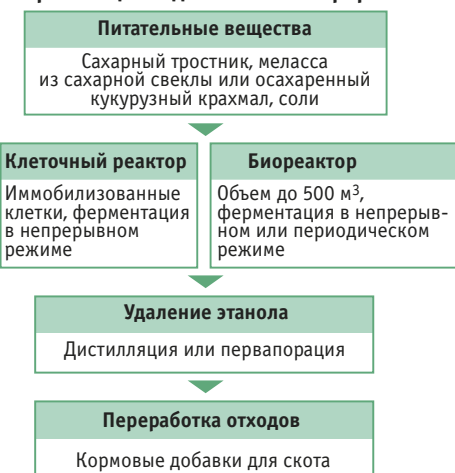


* Регистрационный номер Chemical Abstract Service. – Прим. ред.

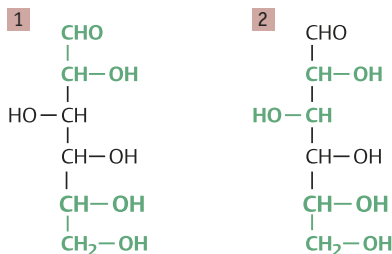
Получение из мелассы



Ферментация и дальнейшая переработка



Этанол



Происхождение атомов углерода в молекуле этанола при сбраживании глюкозы

1 *Saccharomyces cerevisiae*

Гликолиз

2 *Zymomonas mobilis*

путь Энтнера-Дудорова

Организм	Система	Содержание глюкозы, г/л	Скорость истощения, ч ⁻¹	Содержание клеток, г/л	Концентрация этанола, г/л	Максимальный выход продукта, г/л
1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Без возврата клеток в цикл	100	0,17	12	41	7,0
1 <i>S. cerevisiae</i>	С возвратом клеток в цикл	100	0,08	50	43	29
2 <i>S. cerevisiae</i>	С возвратом клеток в цикл	150	0,53	48	60,5	32
1 <i>S. cerevisiae</i>	С возвратом клеток в цикл, вакуум (6,7 кПа)	334	0,23	124	110–160	82
3 <i>Zymomonas mobilis</i>	С возвратом клеток в цикл	100	2,7	38	44,5	120

1 ATCC 4126; 2 NRLL Y-132; 3 ATCC 10988 – штаммы микроорганизмов

1-Бутанол, ацетон

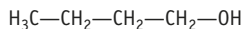
ВВЕДЕНИЕ. 1-Бутанол имеет очень важное значение как растворитель лаков, используемых при покраске автомобилей, а также как сырье в промышленном синтезе (в реакциях этерификации). Объем мирового производства бутанола составляет 1,2 млн т в год. Раньше бутанол служил сырьем при получении синтетического каучука из бутадиена. Ацетон также очень важный растворитель. В мире за год производится около 3 млн т ацетона. В современном производстве основным источником сырья для синтеза этих соединений служат продукты нефтехимической промышленности. До 1950 г. ацетон и 1-бутанол получали в основном при сбраживании мелассы или крахмала с помощью анаэробных бактерий рода *Clostridium*. В связи с новыми возможностями, которые открываются в эпоху развития биотехнологии, ферментативных методов получения ацетона и 1-бутанола вновь приобрели значение после их оптимизации и рассматриваются в качестве «резервных» технологий.

МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСИНТЕЗ. Среди немногочисленных бактерий-продуцентов ацетона и 1-бутанола наиболее важное значение в производственных технологиях имеют анаэробные бактерии рода *Clostridium*. В ацетоно-бутиловом брожении можно выделить две фазы: первая — бактерии активно размножаются, и в среде накапливаются ацетат и бутират, что приводит к понижению pH до 5,0. При таком низком pH размножение бактерий практически заканчивается, и брожение переходит во вторую фазу — накопление 1-бутанола и ацетона, образующихся из имеющихся в среде углеводов и накопленных в первой фазе кислот. Состав конечного продукта зависит от используемого бактериального штамма. Наиболее хорошо изучена физиология *Clostridium acetobutylicum*, который обладает самой высокой продуктивностью, а также достаточно устойчив к токсичному действию 1-бутанола. При сбраживании 100 г глюкозы с помощью *Clostridium acetobutylicum* образуется 38 г смеси бутанола и ацетона в соотношении 3:1. Многие представители рода *Clostridium* содержат амилазы, амилоглюкозидазы и другие внеклеточные деполимеразы, поэтому для их культивирования можно использовать такое дешевое питательное вещество, как крахмал. Перспективным признано применение лактозы (в виде молочной сыворотки). К настоящему времени изучены механизмы действия и регуляции практически всех ферментов, участвующих в биосинтезе ацетона и 1-бутанола, гены большинства этих ферментов уже клонированы. При гликолизе из глюкозы образуется пируват, который под действием фермента пируват: ферредоксин-оксидоредуктазы декарбоксилируется с образованием ацетил-КоА. Продуктируемые в процессе гликолиза восстановительные эквиваленты (прежде всего NADH)

обеспечивают дальнейшие превращения ацетил-КоА в C₂-, C₃- или C₄-соединения. В реакции, катализируемой гидрогеназой, молекулярный водород служит донором электронов. Знание механизмов регуляции активности этого фермента может позволить осуществлять контроль за составом конечного продукта (metabolic engineering), поэтому в настоящее время ведутся активные исследования, посвященные изучению гидрогеназы. Геном *C. acetobutylicum* полностью прочитан, и с этим микроорганизмом возможны генетические манипуляции. Так, разработаны челночные векторы для *C. acetobutylicum* и *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*, а также системы с использованием транспозонов и специфических фагов. Методами генетической инженерии на основе диких и мутантных штаммов удалось значительно повысить выход ацетона и 1-бутанола.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ПРОЦЕСС И ПЕРВИЧНАЯ ОБРАБОТКА. В течение более 40 лет ферментативное получение ацетона и 1-бутанола с помощью *C. acetobutylicum* в промышленных масштабах осуществляли в ферментерах с рабочим объемом более 100 м³. При этом около 60% производственных затрат приходилось на закупку сырья, а примерно 12% — на энергетические расходы при дистилляции. В современном производстве используются двустадийные технологии с возвратом клеток в производственный цикл, непрерывная ферментация, технологии с иммобилизацией клеток, а также усовершенствованные технологии выделения продуктов ферментации (первапорация, обратный осмос). Традиционные технологии, которые применялись в Северной Америке и ЮАР, с периодическим режимом культивирования клеток на кукурузном крахмале или мелассе в качестве сырья менее выгодны по сравнению с получением ацетона и 1-бутанола из продуктов нефтехимии. Экономическая целесообразность использования той или иной технологии определяется расходом сырья (кг продукта/кг сахара) и продуктивностью (кг продукта/(час·литр культуры)). Технология совершенствуется по двум направлениям. Во-первых, генно-инженерными методами удалось получить штаммы, устойчивые к токсичному действию ацетона и 1-бутанола, а изучение биохимических и физиологических особенностей жизнедеятельности микроорганизмов привело к созданию новых штаммов-суперпродуцентов. Во-вторых, можно повысить эффективность производства путем совершенствования самого технологического процесса, в том числе условий ферментации и выделения продуктов. На фоне постоянно растущих цен на нефть метод ферментативного получения ацетона и 1-бутанола, вероятно, вновь приобретет важное значение.

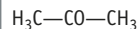
1-Бутанол



M_R 74,12
 d 0,81
 $T_{кип}$ 117–118 °С
 Код CAS 71-36-3

Химический синтез:
 гидроформилирование пропилена
 с последующим гидрированием

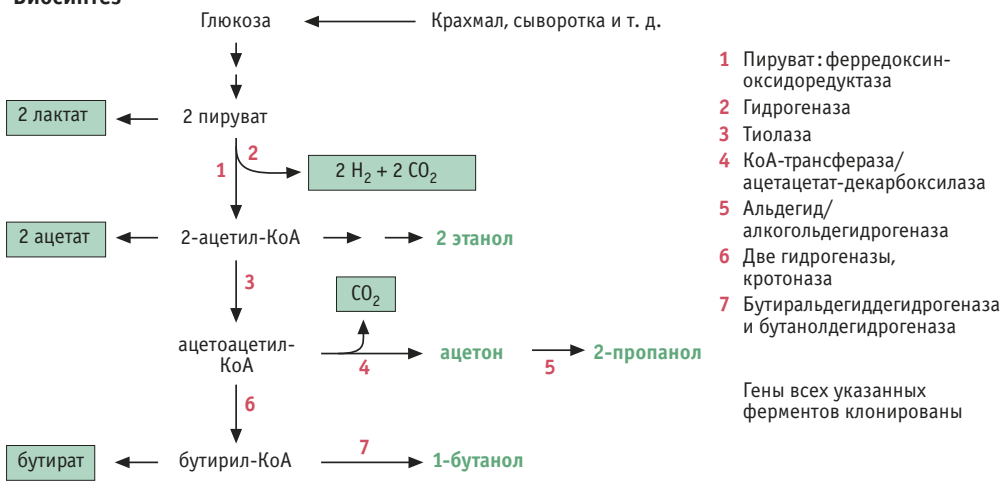
Ацетон



M_R 58,08
 d 0,7908
 $T_{кип}$ 56 °С
 Код CAS 67-64-1

Каталитическое дегидрирование 2-пропанола
 Прямое окисление пропилена
 Расщепление кумолгидропероксида

Биосинтез



Ферментация и первичная обработка

Споры
 Суспензия в образце почвы

Жидкая культура
 Анаэробные условия,
 24 ч при 37 °С

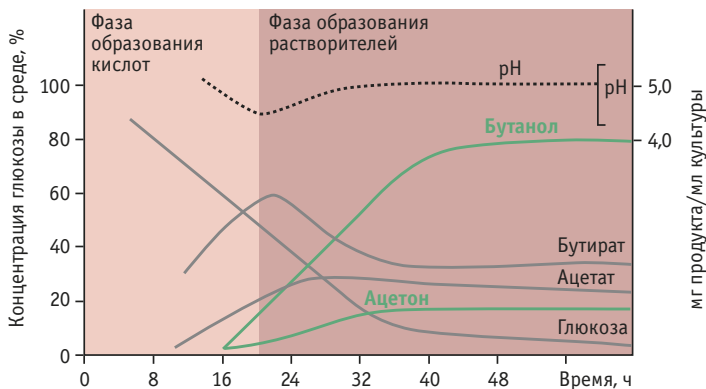
**Биореактор
 объемом 15 м³**
 Пропускание CO₂,
 18 ч при 37 °С

**Биореактор
 объемом 700 м³**
 6% меласса,
 50–60 ч при 37 °С

**Непрерывная
 дистилляция**
 Затем фракционная
 перегонка

Около 38 кг
 смеси 1-бутанол: ацетон
 (3 : 1) из 100 кг глюкозы

Сбраживание глюкозы под действием
Clostridium acetobutylicum



Микроорганизм	Выход продукта, %			
	1-Бутанол	Ацетон	2-Пропанол	Этанол
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	30,2	14,0	–	5,0
<i>C. beijerinckii</i>	67,9	6,0	–	–
<i>C. puniceum</i>	75,6	16,8	–	–
<i>C. tetanomorphum</i>	47,1	–	–	42,7
<i>C. butyricum</i>	17,0	–	7,0	–

Уксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ. Уксус в качестве вкусовой добавки или консерванта использовался в Европе еще в античные времена. Он также находит широкое применение и в классической кухне народов Азии. По традиционной технологии уксус получали из вина. Один из знаменитых примеров — бальзамический уксус, который является своеобразной «кулинарной достопримечательностью» города Модена (Италия). Во Франции в XVIII в., когда еще трудно было говорить о развитии промышленности, существовал так называемый «стружечный» способ получения уксуса — разведенное вино наливали в бочки с древесной стружкой, вымоченной в уксусе. В 1856 г. Луи Пастер обнаружил микроорганизмы, осуществляющие уксуснокислое брожение — уксуснокислые бактерии. К 1868 г., изучая различные среды роста, он получил чистую культуру этих бактерий и таким образом заложил основы технологического метода получения винного уксуса (содержание уксусной кислоты около 6%). Столовый уксус — 5%-й раствор уксусной кислоты, как правило, получают ферментацией ректификата (этанола). Мировое производство уксусной кислоты составляет несколько млрд литров в год. В США в больших количествах используется ацетат кальция-магния (температура плавления $-7,7$ °C), полученный биотехнологическим методом, как реагент для борьбы с обледенением на автотрассах (Cryotech SMA™). Химический реактив «ледяная уксусная кислота» (99,7%, pK_a 5,6) производят из этилена или метанола.

МИКРООРГАНИЗМЫ В БИОСИНТЕЗЕ. Способностью осуществлять неполное окисление этанола с образованием уксусной кислоты обладают лишь немногие микроорганизмы, в частности, некоторые штаммы *Gluconobacter* и *Acetobacter*. Принадлежность бактерий к тому или иному штамму определить очень сложно из-за быстро меняющегося фенотипа, поэтому с этой целью используют анализ последовательностей 16S-rPHK или плазмид. Окисление этанола происходит в реакциях, катализируемых мембраносвязанными ферментами алкогольдегидрогеназой и альдегиддегидрогеназой. В клетках *Acetobacter* альдегиддегидрогеназа несет в качестве простетической группы пирролхлинолинхинон (ПХХ), а альдегиддегидрогеназа наряду с пирролхлинолинхиноном содержит еще гем. Перенос электронов на терминальную оксидазу происходит через образование убихинона. Уксуснокислые бактерии осуществляют гликолиз, образуящиеся молекулы пирувата поступают в цикл лимонной кислоты. Уксуснокислые бактерии чрезвычайно требовательны к высокой концентрации кислорода в среде роста: прерывание аэрации всего на несколько минут приводит к значительному снижению эффективности окисления этанола. В от-

сутствие этанола бактерии рода *Acetobacter* окисляют уксусную кислоту до углекислого газа.

ФЕРМЕНТАЦИЯ И ПЕРЕРАБОТКА. Для получения стартовой культуры *Acetobacter sp.* в пилотном ферментере клетки культивируют на сусле (вино или спирт, 1%-ная уксусная кислота, питательные вещества). После начала образования кислоты устанавливают повторяющийся цикл: когда концентрация спирта снижается до 0,2% (воздух в ферментере встроены датчик), более половины культуральной жидкости удаляют, и добавляют новое сусло. Для интенсивной аэрации без вспенивания жидкости (воздух в ферментере подают со скоростью, равной 1/10 объема ферментера за минуту) служат специальные мешалки, сконструированные Фрингсом. Тепло, выделяемое бактериями в результате метаболизма, отводится системой охлаждения. Средняя эффективность процесса в ферментере объемом 100 м³ составляет 1,6 г/л. Раствор уксусной кислоты из ферментера пропускают через мембранные фильтры, пастеризуют и разводят до концентрации столового уксуса. При использовании специальных штаммов и регулировании условий ферментации образуется 17,5%-й уксус, а более концентрированный уксус для производства консервов получают двухступенчатой ферментацией. Около 70% всего производимого в мире столового уксуса получают в ферментерах, изобретенных Фрингсом (способ Фрингса). Их количество в мире превышает 700. Альтернативой биореактору Фрингса является эрлифтный реактор с иммобилизованными уксуснокислыми бактериями: этот метод позволяет получать высокий выход продукта (свыше 100 г/л), однако пока редко используется в промышленных масштабах.

Уксусная кислота



M_R 60,05

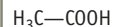
$T_{кип}$ 117,9 °С

pK_a 4,76 (25 °С)

Код CAS 67-19-7

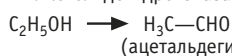
Химический синтез:

окисление этилена
или реакция CO с метанолом

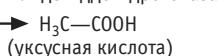


Биосинтез с участием *Acetobacter sp.*

Алькоголдегидрогеназа

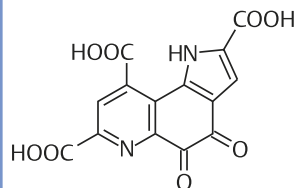


Альдегиддегидрогеназа



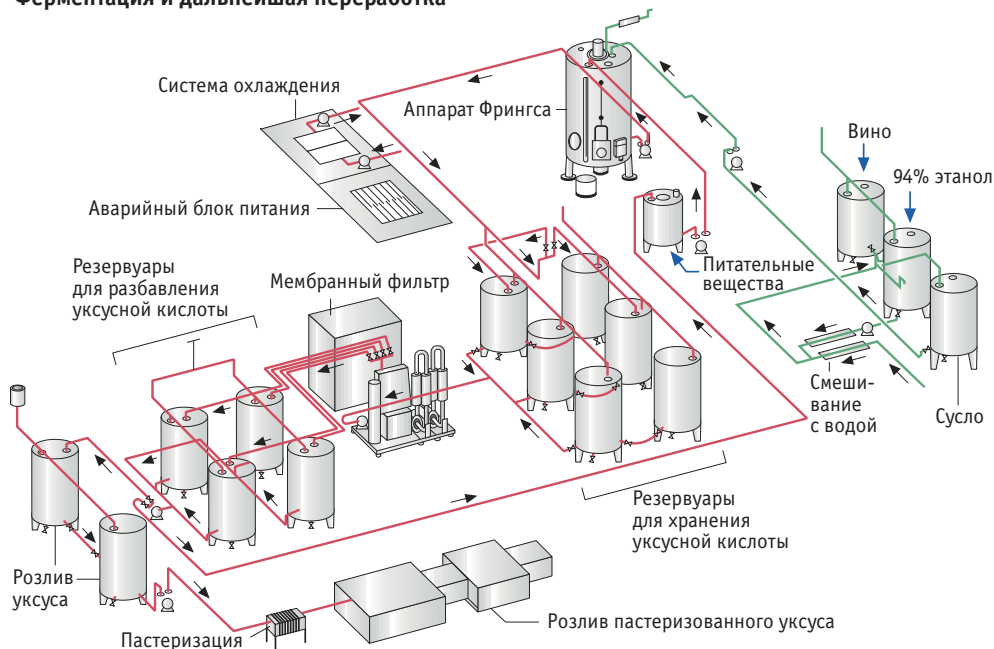
«полное окисление»

Мембраносвязанные ПХХ-зависимые дегидрогеназы передают на убихинон высвобождаемые при окислении электроны, которые затем поступают на терминальную оксидазу – также мембраносвязанный фермент.



Пирролхинолинхинон (ПХХ)

Ферментация и дальнейшая переработка



Другие технологии получения уксусной кислоты

	Максимальное содержание уксусной кислоты, %	Продуктивность процесса, л/м ³ в сут.	Особенности
Стандартный метод (с периодическим режимом)	15	35–50	Простой технологический процесс
Одностадийный процесс с высоким выходом уксусной кислоты	18,5	30–50	Высокая концентрация конечного продукта, низкие затраты на хранение и транспортировку
Двухстадийный процесс с высоким выходом уксусной кислоты	Более 20	30–50	Высокая концентрация конечного продукта, низкие затраты на хранение и транспортировку
Непрерывный ферментативный процесс	Более 10	До 60	Высокая концентрация конечного продукта, более низкие затраты на хранение и транспортировку
Иммобилизованные уксуснокислые бактерии (стадия испытаний)	Менее 9	–	Эрлифтные реакторы; работают на протяжении 460 сут.

Лимонная кислота

ВВЕДЕНИЕ. В 1822 г. Карл Вильгельм Шееле впервые выделил D-лимонную кислоту из лимонного сока и изучил ее свойства. Значительные количества этой кислоты содержатся во многих фруктовых соках. Хансу Кребсу принадлежит одно из самых замечательных открытий в биохимии: в 1937 г. он показал, что лимонная кислота является ключевым соединением аэробного обмена веществ (цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса). За сутки в организме взрослого человека образуется около 1,5 кг лимонной кислоты, которая затем подвергается дальнейшим превращениям. Лимонная кислота — сильная кислота с трехступенчатой диссоциацией: pK_a при 25 °С составляют 3,13, 4,78 и 6,43 соответственно. В 1%-м растворе лимонной кислоты pH 2,2. Наличие трех карбоксильных и одной гидроксильной группы определяет способность лимонной кислоты к образованию комплексов с двух- и трехвалентными катионами. Промышленное получение лимонной кислоты основано на ферментативном процессе. Мировое производство лимонной кислоты составляет 1 200 000 т в год (2005), объем рынка — около 1 200 млрд долларов США. Лимонная кислота используется как подкислитель и консервирующий агент в пищевой промышленности, комплексообразователь в металлургии, средство для смягчения воды при производстве стиральных порошков и для неотложной помощи при тяжелых отравлениях солями металлов.

МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСИНТЕЗ. Некоторые плесневые грибы, в частности *Aspergillus niger*, в условиях избытка глюкозы и интенсивной аэрации во время экспоненциальной фазы роста и после ее окончания выделяют в среду значительное количество лимонной кислоты. Несмотря на то что многие промежуточные продукты цикла Кребса оказывают регуляторное влияние на другие процессы обмена веществ, возможно создание штаммов *A. niger* — суперпродуцентов лимонной кислоты. Во-первых, запас оксалоацетата постоянно растет за счет активности находящейся в цитоплазме пируваткарбоксилазы, которая катализирует присоединение молекулы CO_2 к пирувату с образованием оксалоацетата (анаплеротическая, т. е. возмещающая реакция). Во-вторых, лимонная кислота синтезируется в митохондриях, секретуруется в цитоплазму, а затем выводится из клетки. Причина существования такого направленного транспорта в том, что цитоплазматическая малатдегидрогеназа катализирует превращение оксалоацетата в яблочную кислоту, молекулы которой проникают в митохондрии, заменяя молекулы лимонной кислоты (принцип антипорта).

ПРОМЫШЛЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ИЗ САХАРОВ. Для промышленного производства лимонной кислоты используют твердофазную ферментацию сахаров под действием *A. niger*. В открытые металлические резервуары, устойчивые к кислой среде, помещают раствор сахаров и споры гриба. Для дополнительной аэрации и отведения тепла в суспензию пропускают воздух с интенсивностью до 10 объемов ферментера в минуту. Через пять суток образуется хорошо развитый мицелий, в котором активизируется синтез лимонной кислоты (продолжительность всего процесса 8 сут.). После удаления мицелия проводят экстракцию горячей водой и осаждение цитрата. Выход продукта достигает 50 г/кг сахара. В современной промышленности цитрат получают в башенных биореакторах или реакторах с механическим перемешиванием в стерильных условиях. Объем таких реакторов от 100 до 500 м³. pH продукта на выходе ~2,0, поэтому ферментеры должны быть выполнены из устойчивой к агрессивной среде высококачественной стали. В качестве экономически выгодного сырья используют гидролизат крахмала или дешевые источники сахарозы. Эффективность образования цитрата зависит от содержания ионов марганца в среде: в среде с низким содержанием марганца (менее 2 мкг/л) синтезируется большое количество продукта. Нарращивание клеточной массы завершается через 48 ч роста при pH 5. Последующее искусственное закисление среды до pH 2,5, добавление сахаров при непрерывной ферментации и интенсификация аэрации способствуют образованию лимонной кислоты. Продукт выделяется клетками во внеклеточную среду. В расчете на потребленную глюкозу выход лимонной кислоты более 80%. По завершении ферментации мицелий отфильтровывают, в раствор цитрата добавляют $Ca(OH)_2$, далее цитрат кальция переводят в кислоту серной кислотой. Сырой продукт обрабатывают активированным углем и пропускают через ионообменную колонку. В растворе кристаллизуется очень чистая лимонная кислота. Расход гипса более 1 т/т лимонной кислоты. В настоящее время большое распространение получает другой более экономичный способ очистки лимонной кислоты: после реакции цитрата с трилауриламином продукт экстрагируют с помощью алканов и 1-октанола. Растворители и трилауриламин можно вновь использовать после соответствующей обработки. В последние годы был разработан метод получения D-лимонной кислоты из фракций нефти с помощью особого штамма дрожжей. Проект был доведен до этапа создания пилотной установки, однако в связи с резким повышением цен на нефть пока отложен.

Лимонная кислота



Код CAS 77-92-9

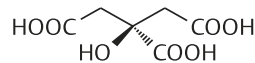
M_R

192,12

Растворимость 600 г/л воды (20 °С)

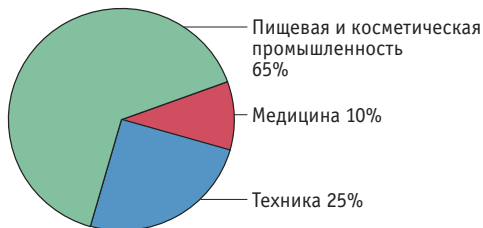
Кислотные свойства $pK_{a1} = 3,128$ (25 °С); в 1%-м водном растворе лимонной кислоты pH 2,2

Комплексообразование (lgK): Fe^{3+} 12,5, Ca^{2+} 4,68, Cu^{2+} 3,98 (при 20 °С)

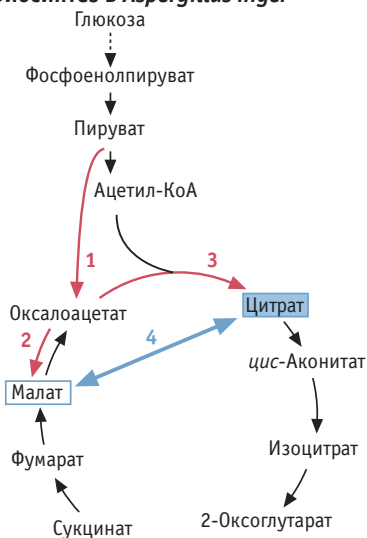


Источники и применение

Источники	г/кг
Лимоны	40–80
Грейпфруты	12–21
Малина	10–13
Черная смородина	15–30
Клубника	6–8
Томаты	2,5



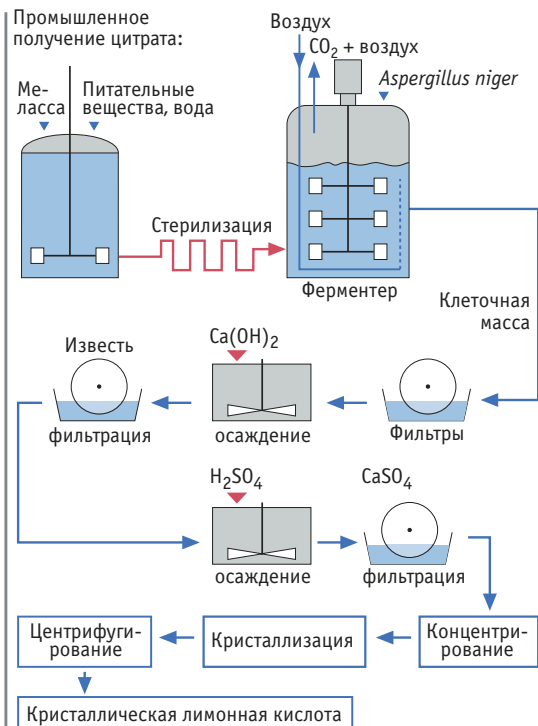
Биосинтез в *Aspergillus niger*



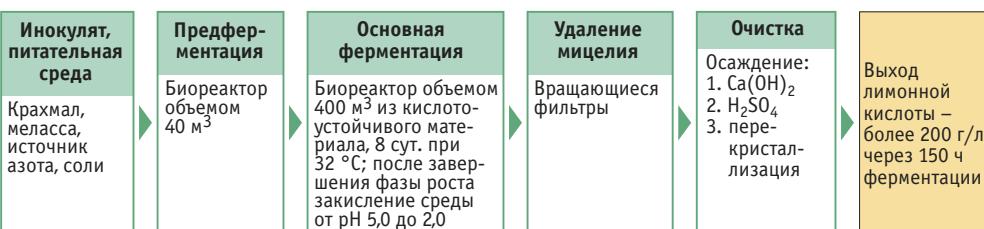
Анаплеротические реакции

цикла трикарбоновых кислот:

- 1 Пируваткарбоксилаза (в цитоплазме)
- 2 Малатдегидрогеназа (в цитоплазме)
- 3 Цитратсинтаза (в митохондриях)
- 4 Цитрат/малат-антипортёр (мембрана митохондрий)



Ферментация и переработка

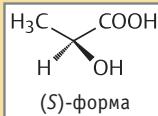


Молочная и глюконовая кислоты

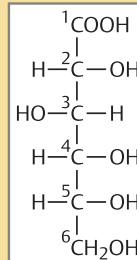
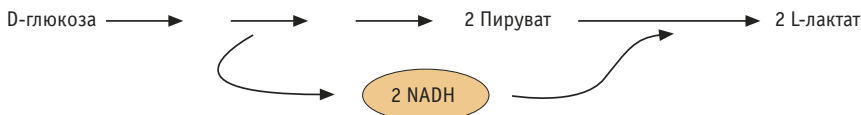
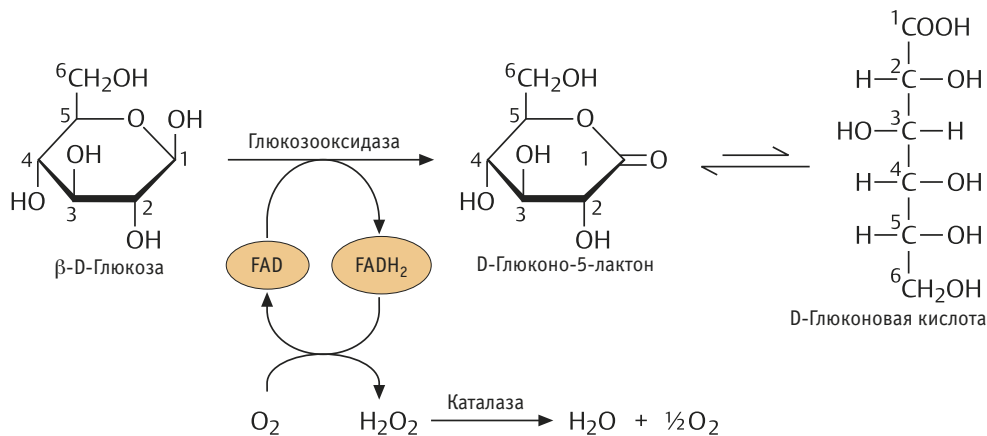
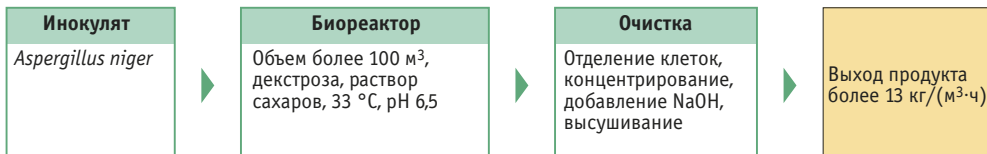
ВВЕДЕНИЕ. Объем мирового производства молочной кислоты за 2001 г. составил 860 000 т, из которых 30 000 т получены путем ферментации. Благодаря умеренно кислому вкусу и консервирующим свойствам молочная кислота находит широкое применение в пищевой промышленности (до 85% всего произведенного объема). Молочная кислота технической чистоты используется в кожевенном и текстильном производствах, а также служит сырьем для синтеза полимеров, поддающихся биологической деградации, например полилактоидов. Ежегодно в мире производится более 100 000 т L-молочной кислоты, которая идет на производство полиэфирного волокна (Nature Works™), которое разлагается под действием микроорганизмов. Производство D-глюконовой кислоты, ее натриевой соли и δ-лактона – изомера D-глюконовой кислоты составляет 60 000 т в год. δ-Лактон также применяется в пищевой промышленности в качестве мягкого подкислителя. При лечении болезней, связанных с недостатком Ca^{2+} и Fe^{3+} в организме, в растворы для инфузии добавляют глюконаты кальция и железа, так как эти соли не токсичны и очень хорошо растворимы в воде. Глюконовая кислота – сильный комплексообразователь в щелочных условиях, поэтому значительная часть (около 50%) глюконовой кислоты в виде натриевой соли используется в технических целях – как средство для очистки стекол, удаления ржавчины и разрыхления цемента, а также в текстильной промышленности для предотвращения загрязнения тканей солями металлов. pK_a D-глюконовой кислоты 3,7.

МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСИНТЕЗ. Для промышленного производства молочной кислоты используют штаммы *Lactobacillus*. Выбор того или иного штамма зависит от наиболее доступного источника углерода. Полное превращение субстрата происходит только в случае гомоферментативного молочнокислого брожения – из 1 моль D-глюкозы образуется 2 моль L-молочной кислоты. Процесс неполного окисления D-глюкозы – образование D-глюконовой кислоты – описан для некоторых грибов (*Aspergillus niger*, некоторых представителей рода *Penicillium*), а также для уксуснокислых бактерий рода *Gluconobacter*. У грибов реакцию катализирует глюкозооксидаза – флавиносодержащий фермент, локализованный в клеточной стенке. В условиях промышленной ферментации глюкозооксидаза обнаруживается и в среде роста гриба. Штаммы *Gluconobacter* осуществляют неполное окисление D-глюкозы с помощью мембраносвязанного фермента D-глюкозодегидрогеназы. Так же, как алкоголь- и альдегиддегидрогеназы уксуснокислых бактерий, D-глюкозодегидрогеназа в клетках *Gluconobacter* является ПХХ-зависимым ферментом.

ФЕРМЕНТАЦИЯ И ПЕРЕРАБОТКА. В последнее время метод ферментативного получения молочной кислоты составляет конкуренцию химическому синтезу (путем гидратирования акриловой кислоты или присоединения HCN к ацетальдегиду). В зависимости от доступного источника углерода выбирают различные штаммы *Lactobacillus*: если в питательную среду добавляют декстрозу или раствор других сахаров, используют штаммы *L. delbrueckii* или *L. leichmannii*, а в случае роста на сыворотке – *L. bulgaricus*. Наряду с сахарами (12–18%) питательная среда должна содержать источник азота, фосфаты и витамины группы В. Ферментацию проводят в условиях ограниченного доступа кислорода при температуре 45–50 °С в течение 2–6 сут. в зависимости от начальной концентрации субстрата. Добавление CaCO_3 , нейтрализующего кислоту, обеспечивает постоянство pH 5,5–6,0. После отделения клеточной массы лактат кальция переводят в молочную кислоту серной кислотой. Далее молочную кислоту подвергают очистке с применением одной из двух методик – пропускают через ионообменную колонку или перегоняют метиллактат (эфир молочной кислоты и метанола). В стадии разработки находятся другие методики получения чистой молочной кислоты: экстракция растворителями, мембранное фильтрование и хроматографическая очистка самой молочной кислоты без стадии образования кальциевой соли. D-Глюконовую кислоту получают из D-глюкозы в ферментерах большого объема с использованием *Aspergillus niger*. При $\text{pH} > 3$ в клетках грибных гиф образуется фермент клеточной стенки глюкозооксидаза, которая окисляет D-глюкозу до D-глюконо-5-лактона. Этот лактон гидролизуетса самопроизвольно или под действием лактоназы до D-глюконовой кислоты. Ферментацию с целью получения натриевых и кальциевых солей глюконовой кислоты проводят при интенсивной аэрации на среде, содержащей 11–25% глюкозы. pH среды поддерживается в интервале 4,5–6,5 путем добавления раскислителей ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaOH}$ или CaCO_3). По окончании ферментации, чтобы выделить соль, среду концентрируют, продукт сушат; в случае же свободной кислоты и лактона используют ионообменники для очистки продукта.

D-молочная кислота, L-молочная кислота M_R 90,08 pK_a 3,80 (25 °C)Код CAS 50-21-5
10326-41-7 (R)-форма
79-33-4 (S)-формаХимический синтез(реакция HCN с ацетальдегидом)
приводит к образованию рацемата**D-глюконовая кислота** M_R 196,16 pK_a 3,7 (25 °C)

Код CAS 526-95-4

**Биосинтез****L-молочная кислота (*Lactobacillus delbrueckii*)****D-глюконовая кислота (*Aspergillus niger*)****Ферментация и переработка****L-молочная кислота****D-глюконовая кислота**

Аминокислоты

ВВЕДЕНИЕ. Аминокислоты стали получать в промышленности около 50 лет назад, после того как были изучены важнейшие этапы обмена веществ. После этого некоторые аминокислоты стали использоваться в медицине, например для приготовления инфузионных растворов, другие (L-метионин, L-лизин и L-треонин) – в качестве кормовых добавок. Объем производства аминокислот значительно увеличился с тех пор, как было обнаружено, что L-глутамат может усиливать вкус, а дипептид аспартам обладает выраженным сладким вкусом. Молекулы всех белков построены из 20 протеиногенных аминокислот. Некоторые аминокислоты не могут синтезироваться в организме, а должны поступать вместе с пищей (незаменимые аминокислоты). Для человека и многих сельскохозяйственных животных незаменимыми аминокислотами являются L-метионин, L-лизин, ароматические аминокислоты (L-фенилаланин, L-тирозин, L-триптофан) и гидрофобные аминокислоты (L-валин, L-лейцин и L-изолейцин). В природе также встречаются «небелковые» аминокислоты, например D-изомеры аминокислот. Их используют в синтетической химии, в том числе при производстве полусинтетических антибиотиков.

ЭКОНОМИЧЕСКИЙ АСПЕКТ. Производство аминокислот составляет более 2 000 000 т/год, что оценивается в сумму более 4 млрд долларов США. Значительная часть предприятий, производящих аминокислоты, расположена в азиатском регионе. Лидирует производство L-глутамата натрия (более 1 500 000 т/год), за ним следуют производства L-лизина (700 000 т/год) и L-метионина (600 000 т/год). L-Аспарагиновая кислота и L-фенилаланин – сырье для получения подсластителя аспартама – производятся в количествах 10 000 т/год. Около 65% производимых аминокислот используются в пищевой промышленности, 30% – как кормовые добавки для скота и лишь 5% аминокислот после дополнительной очистки применяют в медицинских целях, прежде всего для инфузионных растворов, а также в производстве косметических препаратов.

ПОЛУЧЕНИЕ. Существует четыре промышленных метода получения аминокислот: 1) экстракция из гидролизата белка; 2) химический синтез; 3) биотрансформация соединений-предшественников в ферментере или клеточном реакторе; 4) микробная ферментация.

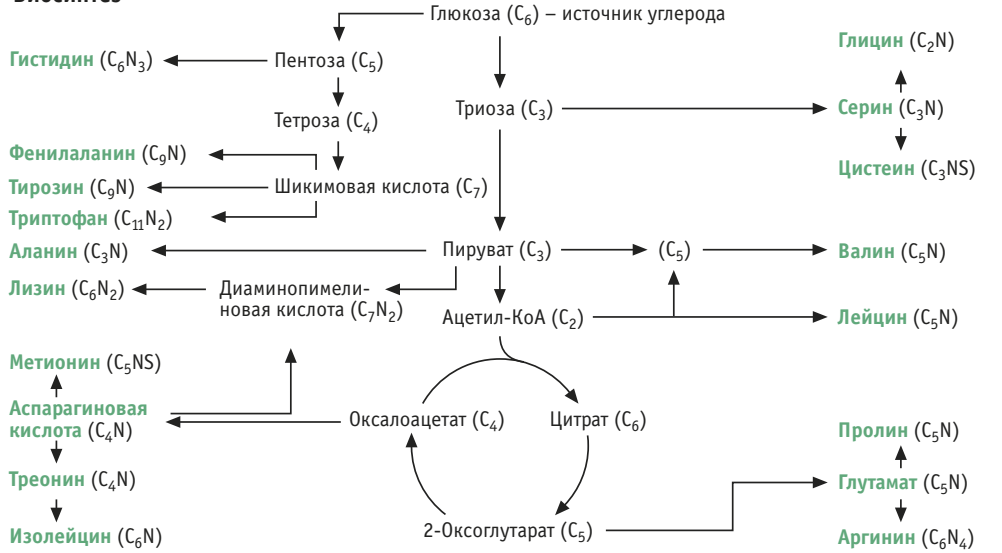
Экстракцией из белкового гидролизата в промышленности получают прежде всего L-цистеин, L-цистин, L-лейцин, L-аспарагин, L-аргинин и L-тирозин. В качестве сырья используют растительные белки или отходы мясной промышленности, которые подвергают кислотному гидролизу, после чего путем

кристаллизации или экстракции спиртом отделяют гидрофобные аминокислоты L-фенилаланин, L-лейцин и L-изолейцин. Затем проводят ионообменную хроматографию, разделяя растворимые аминокислоты на основную, кислую и нейтральную фракции, которые далее перекристаллизовывают и подвергают хроматографической очистке. Химический синтез аминокислот всегда приводит к образованию рацемата (смеси L- и D-изомеров аминокислот), который также находит применение. Например, L,D-метионин применяется в качестве кормовой добавки, L,D-аланин добавляют во фруктовые соки для смягчения вкуса. Для разделения рацематов аминокислот на L- и D-изомеры в молекулу аминокислоты вводят еще один хиральный центр при C_α-атоме. Такие реакции биотрансформации осуществляют в ферментере или клеточном реакторе. Биокатализатором могут служить очищенные ферменты или целые клетки, содержащие необходимый фермент. Экономически выгодно использовать иммобилизованные биокатализаторы, которые позволяют проводить реакцию непрерывно в течение длительного срока. Успех промышленного получения аминокислот объясняется тем, что химический синтез соединений-предшественников относительно дешев. Кроме того, для производства практически всех протеиногенных аминокислот разработаны методы ферментации, и имеются штаммы, позволяющие получать большие количества продукта. Во многих случаях такой подход экономически оправдан. Широко используются штаммы, усовершенствованные методами генетической инженерии. К настоящему времени закончено секвенирование генома *Corynebacterium glutamicum*. Полученная генетическая информация поможет ускорить создание новых высокопродуктивных штаммов. Во многих случаях уже клонированы целые опероны, ответственные за биосинтез аминокислот. Изучаются возможности управления обменом веществ клетки методами так называемой *метаболической инженерии*.

Аминокислоты, получаемые промышленным путем

Аминокислота	Объем производства, т/год	Цена, доллар США/кг	Метод получения	Основные применения
Протеиногенные аминокислоты				
L-Глутамат	> 1 500 000	1	Ферментация	Усилитель вкуса
L-Лизин	700 000	2	Ферментация, ферментный реактор	Кормовая добавка
L-Метионин	600 000	2	Химический синтез	Кормовая добавка
L-Треонин	55 000	5	Ферментация	Кормовая добавка
L-Аспарат	15 000	10	Хиральный пул, биореактор	Аспартам™
L-Глицин	15 000	10	Химический синтез	Подсластитель
L-Фенилаланин	10 000	10	Ферментация, ферментный реактор	Аспартам™, медицина
L-Аргинин	1 000	20	Ферментация, хиральный пул	Медицина, косметика
L-Триптофан	1 400	20	Ферментация, ферментный реактор	Кормовая добавка
Другие аминокислоты	5 000		Хиральный пул, ферментация, ферментный или биореактор	Медицина и др.
Небелковые аминокислоты				
D-Фенилглицин, D- гидроксифенилглицин			Химический синтез	Предшественники ампициллина и амоксициллина
Гидрокситриптофан			Химический синтез	Антидепрессант Окситрипан™

Биосинтез



Методы получения



L-Глутаминовая кислота

ВВЕДЕНИЕ. В 1908 г. японские ученые установили, что L-глутаминовая кислота, содержащаяся в водорослях *Konbu*, может усиливать вкус. Промышленное производство L-глутаминовой кислоты из кислотного гидролизата клейковины пшеницы и соевого белка было начато уже в 1909 г. на фирме Ajinomoto. В 1957 г. сотрудник фирмы Киова Хакко обнаружил, что при выращивании *Corynebacterium glutamicum* в сахаросодержащей среде накапливается L-глутаминовая кислота. В настоящее время в результате усовершенствования штамма и оптимизации технологии ферментации удается получать до 150 г глутамата из 1 л культуры.

МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСИНТЕЗ. В клетках *C. glutamicum* L-глутаминовая кислота образуется при трансаминировании 2-оксоглутаровой кислоты, которая получается при окислении изолимонной кислоты в цикле Кребса. В диком штамме окисление дикарбоновых продуктов цикла Кребса строго регулируется. Изучение генома *C. glutamicum* и способов регуляции активности ферментов привело к созданию нового штамма, в котором: 1) возросла секреция глутамата в среду роста; 2) изменены пути регуляции активности некоторых ферментов, участвующих в биосинтезе L-глутаминовой кислоты; 3) активированы некоторые побочные пути обмена веществ.

Приведем разъяснения.

1. Количество глутамата в культуральной жидкости в большой степени зависит от скорости секреции, и, следовательно, от проницаемости цитоплазматической мембраны. Проницаемость мембран может изменяться. Например, для увеличения проницаемости ограничивают доступ биотина, жирных кислот или глицерина (для ауксотрофов по жирным кислотам или по глицерину соответственно). Добавление в среду пенициллина также приводит к повышению проницаемости клеточной стенки, так как пенициллин препятствует ее образованию.

2. В промышленных штаммах *C. glutamicum* активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы значительно ниже активности L-глутаматдегидрогеназы (K_M различаются примерно в 70 раз, V_{max} — примерно в 150 раз).

3. К наиболее важным анаплеротическим реакциям относятся карбоксилирование фосфоенолпирувата и активация глиоксилатного цикла (в растениях и бактериях). Обе реакции приводят к образованию оксалоацетата, предшественника цитрата, кроме того, в результате этих реакций происходит включение дикарбоновых (C_2) продуктов гликолиза в цикл лимонной кислоты. Фосфоенолпируваткарбоксилаза использует в качестве кофактора биотин, следовательно, изменяя количество биотина, можно регулировать активность фермента. Активность многих

ферментов, участвующих в глиоксилатном цикле, зависит от концентрации метаболитов, конечных продуктов, а также NH_4^+ и $NAD^+/NADH$, поэтому можно «искусственно» менять их активность. Выход продукта в штаммах-продуцентах глутамата можно повысить методами генетической инженерии. В настоящее время геном *C. glutamicum* полностью расшифрован и активно изучается. В частности, исследуют зависимость выхода продукта от введения в геном мультикопийных кассет, несущих ген глутаматдегидрогеназы.

ФЕРМЕНТАЦИЯ И ПЕРВИЧНАЯ ПЕРЕРАБОТКА. В качестве сырья для производства глутамата используют мелассу или гидролизат крахмала. В оптимальных условиях культивирования высокопродуктивные штаммы *C. glutamicum* перерабатывают до 60–70% исходного сырья. Источником азота служат соли аммония и аммиак. При выборе условий роста необходимо оптимизировать концентрацию биотина в среде, а pH среды поддерживать в диапазоне 7,0–8,0. Для синтеза глутамата очень важна аэрация клеточной культуры: оптимальное значение k_d составляет $3,5 \cdot 10^{-6}$ моль кислорода/(атм мин мл). Ферментацию в промышленных масштабах проводят в реакторах с рабочим объемом до 500 м³. Как правило, сначала проводят предферментацию, а затем ферментацию воздушно-проточным способом. Чтобы избежать ингибирования катаболитами, после образования достаточного количества клеток (14 ч роста) в среде поддерживают постоянный уровень глюкозы, не превышающий 0,5%. После удаления клеток ультрафильтрацией глутамат выделяют из культуральной жидкости методами ионообменной или абсорбционной хроматографии (150 г/л через 60 ч роста).

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ. L-Глутамат используется в основном в пищевой промышленности как усилитель вкуса, чаще всего в комбинации с нуклеозидами. В 2004 г. путем ферментации было получено 1 500 000 т L-глутамата. Рыночная стоимость L-глутамата составляет 1000 долларов США за тонну, а объем рынка достигает 1,5 млрд долларов США. Основные производства расположены в странах азиатского региона.

L-Глутаминовая кислота

$C_5H_9NO_4$

Код CAS 56-86-0 (L)-форма

M_R

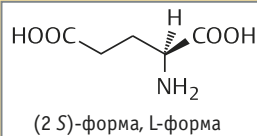
147,13

$T_{пл}$

247–249 °C

Растворимость

600 г/л воды



Биосинтез и штаммы-суперпродуценты глутамата



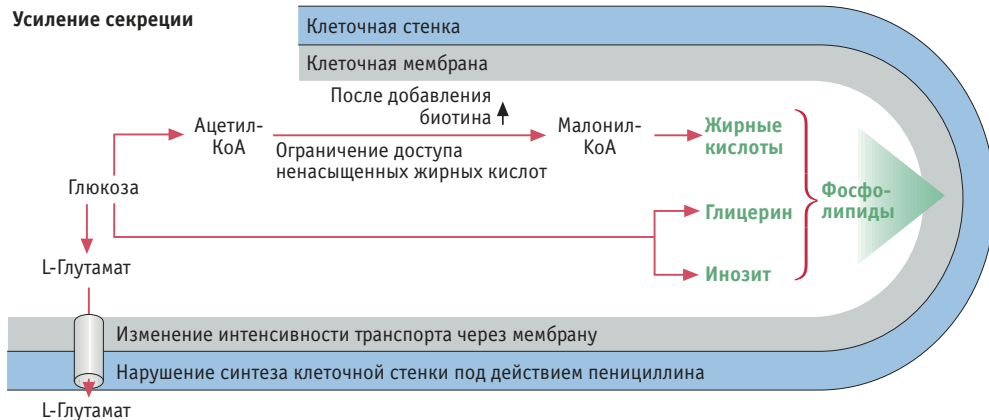
Ферменты

Ферменты	Ген
1 Фосфоенолпируват-карбоксилаза (PEPC)	<i>ppc</i>
2 Пируваткиназа	<i>pyk</i>
3 Пируваткарбоксилаза	<i>pyk</i>
4 Пируватдегидрогеназа	<i>pdh</i>
5 Цитратсинтаза	<i>gltA</i>
6 Аконитаза	<i>citB</i>
7 Изоцитратдегидрогеназа	<i>icd</i>
8 L-Глутаматдегидрогеназа (GDH)	<i>gdh</i>
9 α-Кетоглутарат-дегидрогеназа (KDH)	<i>aceE</i>
10 Изоцитратлиаза (ICL)	<i>aceE</i>
11 Малатсинтаза (MS)	<i>aceB</i>

Штаммы-суперпродуценты:

1. Повышенная активность **PEPC**, **GDH**, **ICL**, **MS**
2. Сниженная активность или инактивация **KDH**
3. Нарушение регуляции активности **PEPC** по механизму обратной связи посредством L-глутамата

Усиление секреции



Ферментация и первичная переработка

Посевной материал, предферментация

Постепенное увеличение объема культуры в реакторе

Ферментация

Биореактор до 500 м³, источник углерода – меласса или гидролизат крахмала, источник азота – аммиак, наличие биотина

Удаление клеток

Пресс-фильтр или ультра-фильтрация

Концентрирование

Ультра-фильтрация

Обработка

Высушивание распылением или кристаллизация

Выход продукта: ~150 г/л через 40–60 ч

D,L-Метионин, L-лизин и L-треонин

ВВЕДЕНИЕ. Основное применение D,L-метионин, L-лизин и L-треонин находят в составе пищевых и кормовых добавок. Это незаменимые аминокислоты для человека и многих сельскохозяйственных животных, т. е. они не образуются в организме и должны поступать вместе с пищей. D,L-Метионин, L-лизин и L-треонин содержатся в белках кукурузы, сои, овса, ячменя, ржи и риса, однако их содержание недостаточно для полноценного питания. Поэтому вегетарианцам рекомендуется дополнительно принимать препараты L-метионина, L-лизина и L-треонина. При откорме скота эти аминокислоты особенно важны: когда основой питания животных являются рис и рожь, прибавка в весе достигается только в том случае, если в корм добавляют L-лизин и L-треонин, а когда животных кормят в основном кукурузой, в их рацион необходимо добавлять D,L-метионин, L-лизин и L-треонин. В промышленности эти аминокислоты получают ферментацией или химическим синтезом.

D,L-МЕТИОНИН. Химический синтез D,L-метионина, L-лизина и L-треонина включает пять стадий. В качестве исходных веществ используют акролеин, метантиол и синильную кислоту. Одним из промежуточных продуктов синтеза является гидантоин – консервант, использующийся при производстве шампуней и моющих средств. В процессе химического синтеза образуется рацемат, в разделении которого нет необходимости, поскольку в организме высших животных D-метионин превращается в L-метионин.

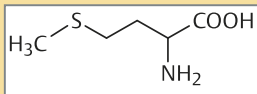
L-ЛИЗИН. В промышленном производстве L-лизина используются штаммы *Corynebacterium glutamicum*. L-Лизин образуется из диаминопимелиновой кислоты, которая в свою очередь получается из оксалоацетата в результате многоступенчатой реакции конденсации аспарагиновой кислоты и пирувата. В диких штаммах в качестве побочных продуктов этой многостадийной реакции образуются предшественники L-треонина и L-метионина, что снижает выход L-лизина. В штаммах-суперпродуцентах этот побочный путь блокирован благодаря мутациям в генах соответствующих ферментов (используют также ауксотрофные мутантные штаммы, для метаболизма которых необходимо присутствие специфических веществ, например гомосерина). В настоящее время клонированы гены почти всех ферментов, участвующих в биосинтезе L-лизина и его регуляции, поэтому методы генетической инженерии играют решающую роль в получении штаммов, характеризующихся высоким уровнем синтеза L-лизина. В современном производстве используются штаммы, в которых выход продукта достигает 120 г/л через 60 ч роста. Как правило, применяют воздушно-проточную ферментацию в реакторах объемом до 500 м³. В среду роста *C. glutami-*

cum в качестве источника углерода добавляют растворы сахаров. Уровень биотина в среде поддерживают на постоянном уровне – около 30 мкг/л. После окончания синтеза и удаления клеток L-лизин выделяют на ионообменной колонке или путем распылительной сушки. Еще одна технология получения L-лизина основана на использовании клеток *Cryptococcus laurentii*. В настоящее время эта технология практически не реализуется, так как не может конкурировать с технологией с использованием *C. glutamicum*. Технология заключается в производстве L-лизина из D,L-α-амино-ε-капролактама в биореакторе, в который добавлены высушенные ацетоном клетки *Cryptococcus laurentii*. Дешевым сырьем в данном случае являются отходы производства нейлона, селективный гидролиз которых приводит к образованию D,L-α-амино-ε-капролактама, который в свою очередь подвергается рацемизации ферментом D-аминокапролактама-рацемазой, выделенной из штамма *Achromobacter obae*.

L-ТРЕОНИН. Мутантные штаммы *Escherichia coli* с измененным путем регуляции биосинтеза являются основными промышленными продуцентами L-треонина. Максимальный выход продукта составляет 80 г/л через 30 ч роста. Уже клонированы гены оперона, отвечающего за биосинтез треонина, и в настоящее время ведутся работы, направленные на получение штаммов с еще более высоким выходом продукта. После отделения клеток проводят ультрафильтрацию культуральной жидкости, а затем L-треонин очищают кристаллизацией.

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ. В 2004 г. было произведено 600 000 т D,L-метионина, 700 000 т L-лизина и 55 000 т L-треонина. Метионин получают преимущественно путем химического синтеза, а L-лизин и L-треонин – ферментацией. Стоимость этих аминокислот 1000–2000 долл. США/т, а объем продаж достигает 500 млн долл. В последнее время наряду с традиционным производством аминокислот для кормовых добавок развивается новая технология – выращивание трансгенных растений с измененным аминокислотным составом. Такие растения в перспективе могут использоваться непосредственно для откорма скота.

D,L-Метионин

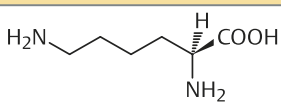


$C_5H_{11}NO_2S$

M_R 149,21

Код CAS 63-68-3

L-Лизин

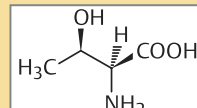


$C_6H_{14}N_2O_2$

M_R 146,19

Код CAS 56-87-1

L-Треонин



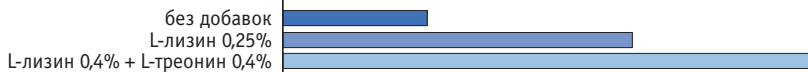
$C_4H_9NO_3$

M_R 119,12

Код CAS 72-19-5

Аминокислоты в кормах

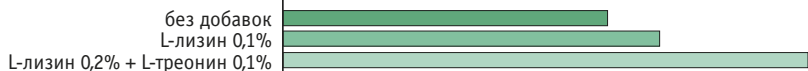
Пшеница



Кукуруза



Рис



Для сравнения: казеин без добавок

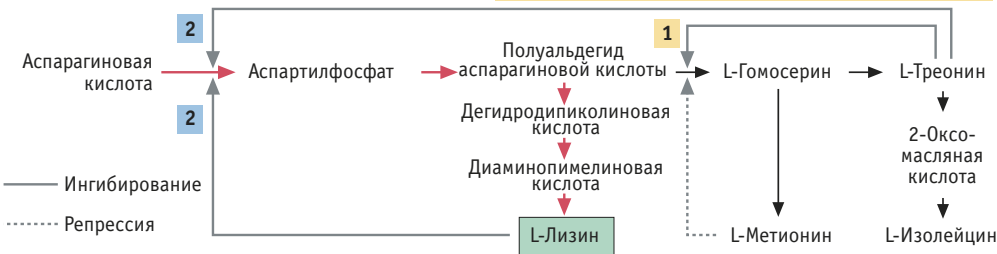
0 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
Относительная пищевая ценность при откорме свиней

Биосинтез и штаммы-суперпродукты

Синтез L-лизина в клетках

Corynebacterium glutamicum

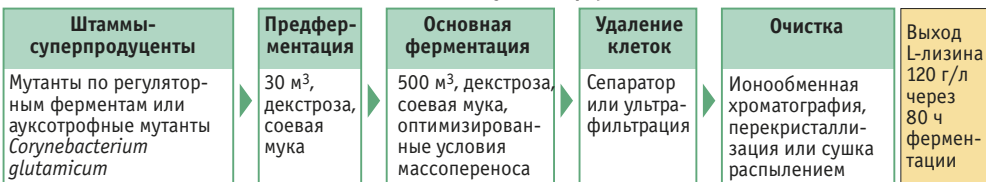
Мутанты с заблокированными побочными процессами в среде с L-гомосерином



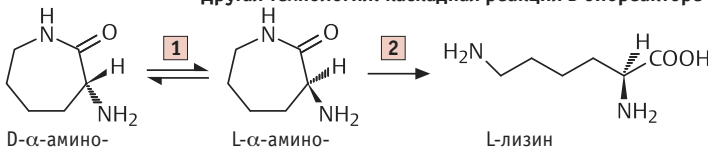
В мутантных штаммах нет ингибирования L-лизинном и L-треонином

Производство L-лизина

Основной метод получения: ферментация



Другая технология: каскадная реакция в биореакторе



1 ACL-рацемеза: *Achromobacter obae*

2 ACL-гидролаза: *Cryptococcus laurentii*

Аспартам™, L-фенилаланин и L-аспарагиновая кислота

ВВЕДЕНИЕ. Аспартам (метилвый эфир L- α -аспартил-L-фенилаланина) – это низкокалорийный искусственный подсластитель, который по сладости в 200 раз превосходит сахар, полученный из сахарной свеклы. Объем производства аспартама составляет 30 000 т/г (2004). Исходными веществами для синтеза аспартама являются L-аспарагиновая кислота и L-фенилаланин. При химическом синтезе аспартама требуются дополнительные затраты на введение защитных групп в молекулы исходных веществ, поэтому в настоящее время применяют ферментативные методы получения этого продукта.

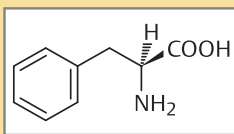
L-АСПАРАГИНОВАЯ КИСЛОТА. Одним из методов получения L-аспарагиновой кислоты является экстракция из белкового гидролизата, однако экономически более выгодным оказался синтез клетками *Escherichia coli* из фумаровой кислоты в присутствии аммиака. Реакцию осуществляет фермент аспартаза, находящаяся в клетках микроорганизма. Как правило, для выращивания клеток используют реактор, в котором бактерии иммобилизованы на к-каррагинане или полиакриламиде. Выход продукта в такой системе достигает 140 г/(л · ч), а срок службы биокатализатора на основе иммобилизованных клеток составляет два года. Использование сублимированных клеток промышленных штаммов позволяет получать до 166 г L-аспарагиновой кислоты с литра клеточной культуры. В лабораторных условиях удалось получить штамм *E. coli* с плазмидой, несущей ген аспартазы (*aspA*). В таком штамме выход L-аспарагиновой кислоты увеличивается в 30 раз.

L-ФЕНИЛАЛАНИН. Традиционно производство L-фенилаланина осуществлялось в ферментативных реакторах на доступном сырье. В последнее время в связи с развитием молекулярно-биологических методов, позволяющих получать генетически модифицированные штаммы-суперпродуценты, все шире используют ферментацию. Распространение ферментативных методов объясняется доступностью и невысокой стоимостью синтетического сырья, а также выгодным соотношением между производственными площадями, временными затратами и выходом продукта. Для производства L-фенилаланина наиболее выгодным оказалось использование биореактора, в котором в присутствии аммиака происходит аминирование коричной кислоты под действием фермента фенилаланинаммиакилазы из *Rhodotorula glutinis*. В таком реакторе выход продукта достигает 50 г/л, а эффективность переработки сырья составляет 83%. Перспективным также считается метод расщепления D,L-5-бензилгидантоина ферментами L-гидантоиназой и L-N-карбамоилазой, выделенными из *Flavobacterium ammoniagenes*. Для ферментации в биореакторах в современном производстве, как правило,

используют штаммы-суперпродуценты *E. coli* или коринебактерий. В этих организмах биосинтез L-фенилаланина из эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата протекает в несколько стадий. В качестве промежуточных соединений образуются шикимовая, префеновая и фенилпирувиноградная кислоты, в диком штамме они предшественники L-триптофана и L-тирозина. Однако в промышленности используют мутантные ауксотрофные штаммы, в которых активность ключевых ферментов строго регулируется. Практически все гены, продукты которых участвуют в биосинтезе L-фенилаланина, к настоящему времени клонированы. Это позволяет получать новые штаммы-суперпродуценты, применяя генно-инженерные методы. Так, выход L-фенилаланина в одном из рекомбинантных штаммов *Brevibacterium fermentum* составляет 45 г на литр клеточной культуры. После завершения ферментации по воздушно-проточному способу клетки отделяют, а затем концентрируют культуральную жидкость ультрафильтрацией. Для окончательной очистки L-фенилаланина применяют ионообменную хроматографию или кристаллизацию.

АСПАРТАМ™. Для синтеза аспартама из L-аспарагиновой кислоты и L-фенилаланина необходимо сначала ввести в исходные молекулы пять защитных групп, а в конце синтеза их удалить. Такой метод значительно сложнее синтеза с использованием протеиназы. В обычных условиях протеолизитические ферменты катализируют гидролиз пептидных связей, однако возможно сдвинуть равновесие в сторону образования пептидной связи. Так, в концентрированных растворах, содержащих L-аспарагиновую кислоту (в которой аминогруппа защищена бензилоксикарбонилем) и метилвый эфир L-фенилаланина, протеиназа катализирует образование малорастворимого пептида, который выпадает в осадок. Особенно важно, что в этой реакции принимает участие только α -карбоксильная группа L-аспарагиновой кислоты, так как изомер аспартама – метилвый эфир L- β -аспартил-L-фенилаланина – обладает сильно выраженным горьким вкусом. В промышленном производстве, как правило, используют иммобилизованную протеиназу термолизин, выделенную из *Bacillus thermoproteolyticus*. Этот фермент устойчив к высоким температурам и может осуществлять реакцию при 70 °С, что значительно повышает эффективность процесса (выход продукта достигает 30 г/л). Образовавшийся аспартам в значительной степени отделен от побочных продуктов, так что для окончательной очистки от примеси исходных веществ достаточно ионообменной хроматографии.

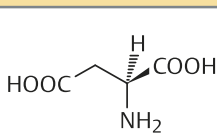
L-Фенилаланин



$C_9H_{11}NO_2$

M_R 165,19
 $T_{пл}$ 310–312 °C
 Код CAS 63-91-2

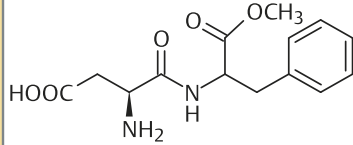
L-Аспарагиновая кислота



$C_4H_7NO_4$

M_R 133,10
 Код CAS 56-84-8

α-Аспартам



$C_{14}H_{18}N_2O_5$

M_R 294,31
 Максимальная суточная доза 40 мг/кг
 Код CAS 22389-47-0

Получение L-фенилаланина

Наиболее распространенный метод – ферментация

Штаммы-суперпродукты: коринебактерии или *E. coli*

Источник С: глюкоза
 Очистка: использование мембран, ионообменная хроматография, перекристаллизация

Более 40 г/л через 60 ч роста

Другой метод – ферментативный реактор

Добавление аммиака к транс-коричной кислоте

Иммобилизованный фермент L-фенилаланин-аммиаклаза из *Rhodotorula glutinis*

Около 50 г/л при 83% конверсии сырья

Получение L-аспарагиновой кислоты

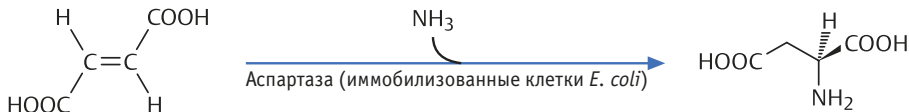
Многоступенчатая реакция в биореакторе

Иммобилизованные клетки *E. coli*; 1,2 М фумаровая кислота, аммиак, рН 8,5; 37°C

Очистка

Добавление H_2SO_4 при 15 °C (рН 2,8) приводит к выпадению аспарагиновой кислоты в осадок

Выход 90–95%, срок службы клеток *E. coli* 2 года



Получение α-аспартама

L-Z-аспарагиновая кислота + D,L-фенилаланин-OMe

иммобилизованный термоллизин (60 °C, 2 ч)

L-Z-аспартил-L-фенилаланин-OMe

гидрирование → ZH

L-α-аспартил-L-фенилаланин-OMe
 α-Аспартам

рацемизация

D-фенилаланин-OMe

→ ферментативный катализ

→ химические реакции

Z = бензилоксикарбонил

Подсластитель	Химическое строение	Относительная сладость
Сахароза	Дисахарид	1
Цикламат	Синтетическая циклогексилсульфаминовая кислота, натриевая соль	40
α-Аспартам	Дипептид, метиловый эфир	200
Стевиозид	Гликозилированный дитерпен	300
Сахарин	Синтетический имид 2-сульфобензойной кислоты, натриевая соль	450
Тауматин	Негликозилированный белок – одна полипептидная цепь из 208 аминокислотных остатков	2500
Монеллин	Негликозилированный белок – две полипептидные цепи из 44 и 50 аминокислотных остатков	2500

Получение L-аминокислот путем ферментативной трансформации

ВВЕДЕНИЕ. Как мы уже видели на примере L-лизина, L-аспарагиновой кислоты и L-фенилаланина, тот или иной энантиомер аминокислоты можно получить путем ферментативных превращений предшественников. В отличие от ферментации использование энантиоспецифичных ферментов позволяет синтезировать небелковые аминокислоты. Для этой цели наиболее широко используют гидролазы, селективно расщепляющие определенные энантиомеры в рацемате. В качестве примера можно привести эстеразы, аминокислотазы, амидазы и гидантоиназы. Недостаток метода заключается в необходимости удаления «неправильного» энантиомера из реакционной смеси, его рацемизации и повторного введения в реакцию. В другом методе используются реакции присоединения, катализируемые лиазами (например, оксинитрилазами), или окислительно-восстановительные реакции, катализируемые оксидоредуктазами; в этих реакциях образуются только «правильные» энантиомеры.

ЭНТИОСЕЛЕКТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ. Наиболее хорошо изучены и активно применяются в современных промышленных процессах аминокислотазы и гидантоиназы. Для осуществления гидролиза рацемата N-ациламиноакилот используют иммобилизованную ацилазу, выделенную из *Aspergillus oryzae* или *Bacillus thermoglucosidius*. В реакции участвуют только L-энантиомеры, а N-ацил-D-аминокислоты, оставшиеся в реакционной смеси после кристаллизации L-аминокислот, подвергают термической рацемизации и снова вводят в реакцию. Таким способом ежегодно производят сотни тонн L-метионина, L-тирозина, L-пролина и L-валина для медицинских нужд. Аналогичным образом можно получать и D-аминокислоты, однако более выгодно использовать доступные предшественники аминокислот – гидантоины. После расщепления гидантоинов специфическими гидантоиназами образуются N-карбамоил-аминокислоты, которые в свою очередь могут быть превращены в D- или L-аминокислоты при помощи карбамоилаз. «Ложный» гидантоин прекращает ферментативную рацемизацию и в ходе оптимизированного путем генетических технологий ферментативного каскада приводит к количественному выходу абиогенных L- и D-аминокислот. Свойство «неправильного» гидантоина рацемизоваться при pH 8,5 легло в основу нового метода, перспективного для промышленного получения D-фенилглицина и 4-гидроксифенилглицина – важных предшественников полусинтетических пенициллинов ампициллина и амоксициллина.

ЭНТИОСЕЛЕКТИВНЫЕ РЕАКЦИИ ПРИСОЕДИНЕНИЯ.

Для осуществления реакций, специфичных для R- и S-энантиомеров, используют соответствующие

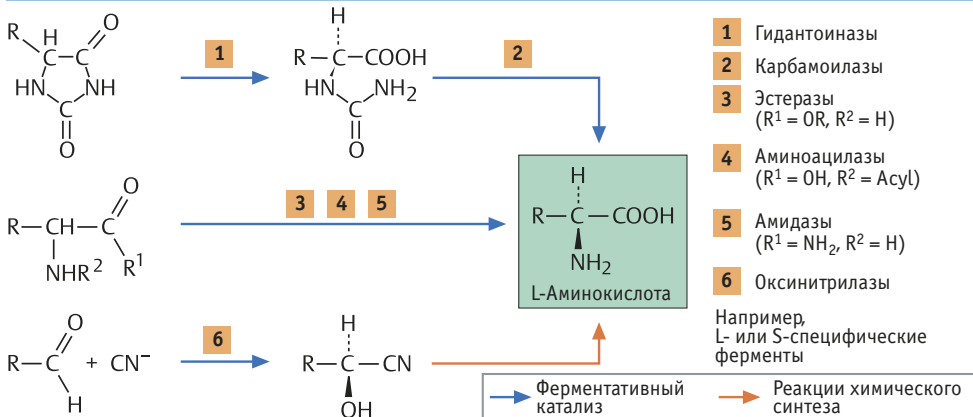
оксинитрилазы – ферменты из растительных тканей. В настоящее время R- и S-оксинитрилазы получены в виде рекомбинантных белков в клетках *E. coli*; при этом ген R-оксинитрилазы клонирован из маниока, а ген S-оксинитрилазы – из миндаля. Определена пространственная структура обоих ферментов и с помощью методов белковой инженерии предприняты попытки усовершенствовать ферменты для промышленного применения.

ЭНТИОСЕЛЕКТИВНЫЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ.

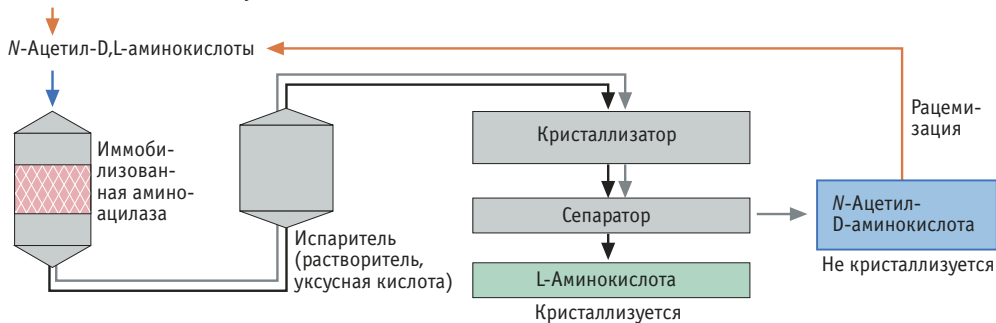
На примере стереоселективного синтеза L-лейцина из α -оксоизокапроновой кислоты видно, что для восстановительного аминирования с помощью L-лейциндегидрогеназы из *Bacillus sp.* кроме NH_3 необходим NADH. Ввиду высокой стоимости кофермента необходимо создать систему его регенерации. Очень элегантно эта проблема решена в случае формиадегидрогеназы из *Candida boidinii*: CO_2 – один из побочных продуктов реакции – сдвигает равновесие в сторону образования L-лейцина. Использование NADH, связанного с полиэтиленгликолем (ПЭГ), позволяет получать до 600 000 молярных эквивалентов продукта из одного моля NADH. В промышленности восстановление NADH в окислительно-восстановительных реакциях происходит на неизменяющемся козниме в порционном режиме. Еще более интенсивно подобный процесс происходит с участием измененных (путем Protein Design или направленной эволюции) ферментов в генетически модифицированных микроорганизмах.

Наиболее хорошо изученные реакции

Тип реакции	Класс фермента	Комментарий
Гидролиз рацемических смесей предшественников	Гидролазы	Простая, широко применяемая, но дорогостоящая реакция, так как «неправильный» энантиомер необходимо вновь рацемизировать
Присоединение HCN или NH ₃ по карбонильной группе	Лиазы	Простая реакция с количественным выходом; недостаток – малый выбор ферментов
Восстановительное аминирование α-оксокарбоновых кислот	Дегидрогеназы	Образуется только один энантиомер, однако это процесс дорогой из-за затрат на системы регенерации кофакторов



Энантиоселективное расщепление D,L-N-ациламинокислот



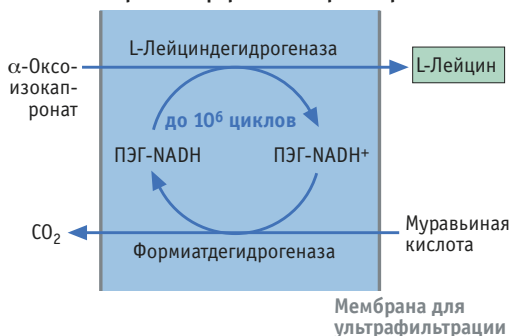
Восстановительное аминирование α-оксокарбоновых кислот

Лейциндегидрогеназа, обладающая широкой субстратной специфичностью, осуществляет реакцию аминирования не только лейцина, но и других α-оксокарбоновых кислот. При этом образуются небелковые аминокислоты, например L-лейцин.

Лейциндегидрогеназа из <i>Bacillus sphaericus</i>	Относительная активность	K _M , mM
α-оксоизокапроат	100	0,31
α-оксоизовалериат	126	1,4
α-оксовалериат	76	1,7
α-оксобутират	57	7,7
α-оксокапроат	46	7,0

ПЭГ-NADH – синтетическое производное NADH с M_R = 3000. Многие дегидрогеназы способны использовать его в качестве кофактора. Для удерживания ПЭГ-NADH в реакционной смеси используют ультрафильтрацию. Реакция протекает со свободным NADH и расходом продукта.

Мембранный ферментный реактор



Антибиотики: источники, применение и механизмы действия

ВВЕДЕНИЕ. Еще в 1928 г. Александр Флеминг обнаружил явление, приведшее к открытию антибиотиков: на культуре стафилококка он заметил грибковую инфекцию, остановившую рост бактерий. Лишь 10 лет спустя Говарду Флори удалось изучить структуру вещества, вызвавшего остановку роста стафилококковых бактерий — пенициллина. Успешные испытания действия пенициллина на лабораторных животных, возможно, вскоре привели бы к его использованию и для лечения людей, однако эти исследования, проводившиеся в рамках большого американско-британского проекта, были прерваны Второй мировой войной. За 1945 г. в мире было произведено несколько килограммов бензилпенициллина. Однако пенициллин действует исключительно на грамположительные бактерии, среди которых не столь часто встречаются возбудители заболеваний человека. В 1947 г. Зельман Ваксман обнаружил в культуре *Streptomyces griseus* антибиотик (стрептомицин), который действовал на грамотрицательные бактерии. В течение последующих лет путем систематического скрининга было выявлено множество новых антибиотиков и разработаны способы их промышленного получения. В результате слишком широкого и зачастую неуместного применения антибиотиков, как в медицинских целях, так и в кормовых добавках, стали появляться новые микроорганизмы — возбудители заболеваний, обладающие устойчивостью к уже известным антибиотикам. Поэтому ведутся разработки новых антибиотиков, а также осуществляются попытки строго ограничить область применения уже существующих. Для поиска новых антибиотиков используют скрининг, слияние клеток продуцентов различных антибиотиков и проводят поиск новых мишеней действия антибиотиков на основе анализа генома патогенных микроорганизмов (gene shuffling).

ИСТОЧНИКИ. На сегодняшний день более 8000 антибиотиков выделены из микроорганизмов, а около 4000 получены из других организмов: лишайников, растений и животных. Наиболее важным и широким классом продуцентов антибиотиков являются грибы — актиномицеты.

ПРИМЕНЕНИЕ. Промышленным способом сейчас получают около 200 антибиотиков, при этом большинство препаратов являются полусинтетическими природными соединениями, т. е. биологическую активность которых как антибиотиков удалось проявить путем изменений в их молекуле, вносимых химическими или биотехнологическими методами. Примерно две трети объема мирового рынка (32 млрд долл. США) приходится на β-лактамные антибиотики (пенициллины и цефалоспорины), объем их производства составляет более 50 000 т/г. Значительное количество антибиотиков используются в медицине

для борьбы с микробными инфекциями, при этом различают антибиотики с широким спектром действия (например, цефалоспорины и тетрациклин) и селективные антибиотики, которые действуют на определенных возбудителей болезней (например, рифампицин активен против легочной формы туберкулеза, амфотерицин В — против грибковых инфекций). Для терапии рака применяют так называемые «противоопухолевые» антибиотики (в частности, адриамицин) — токсичные вещества, действующие как цитостатики. В растениеводстве в качестве пестицидов также используют антибиотики (бластицидин S и казугамицин): они эффективны в очень низких концентрациях и практически безвредны для теплокровных организмов. Некоторые антибиотики применяют в качестве консервантов при изготовлении пищевых продуктов, например пимарицин используется в сыроварении для защиты от грибковой инфекции. Существуют так называемые «кормовые» антибиотики — те, что добавляют в корм сельскохозяйственных животных для лучшего усвоения пищи и быстрой прибавки в весе. Исключительно важной задачей представляется разработка новых антибиотиков, которые препятствуют возникновению новых штаммов микроорганизмов, устойчивых к ранее применявшимся антибиотикам (в том числе монензин — препарат, добавляемый в корм сельскохозяйственных птиц). В биохимических и молекулярных исследованиях антибиотики используются как селективные ингибиторы различных клеточных функций.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ. Антимикробное действие антибиотиков обусловлено подавлением следующих функций клеток микроорганизма: 1) биосинтез и функционирование генов; 2) биосинтез клеточных компонентов; 3) биосинтез и функционирование белков; 4) биосинтез и функционирование клеточной мембраны; 5) биосинтез клеточной стенки. Как правило, действие антибиотика является результатом сложной цепи его взаимодействий с клеточными компонентами. У микроорганизмов существует генетически запрограммированный механизм приспособления к изменяющимся условиям среды, поэтому создание новых антибиотиков и появление новых резистентных штаммов микроорганизмов происходят практически в одно и то же время.

Источники антибиотиков*

Таксономическая группа	Относительная доля (%)
Актиномицеты	50
Бактерии	10
Грибы	20
Лишайники	1
Водоросли	2
Растения	15
Животные	2

* Из примерно 25 000 биологически активных веществ

Объем рынка некоторых антибиотиков*

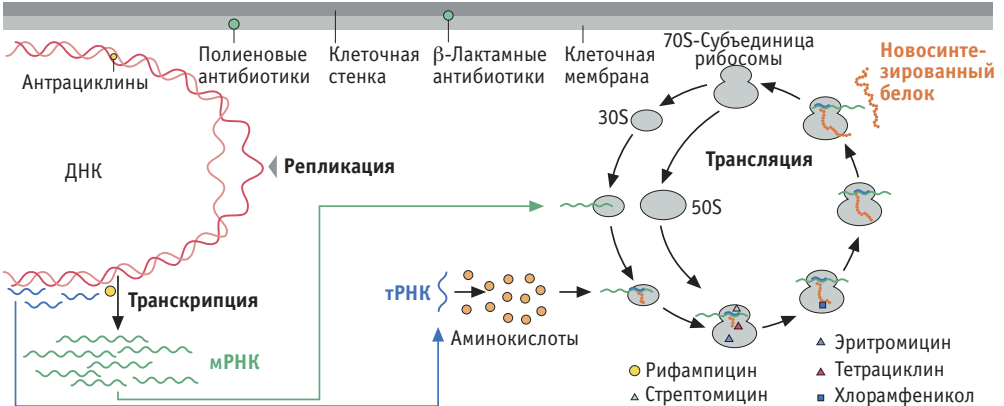
Тип антибиотика	Объем рынка (10 ⁹ долл. США)
Цефалоспорины	9,0
Пенициллины/ингибиторы лактамаз	6,9
Хинолон (синтетический)	5,8
Макролиды	5,7
Пептидные антибиотики, гликопептиды	0,1
Аминогликозиды	0,8
Тетрациклины	0,9
Другие вещества	2,5
Всего	31,7

* Данные 2004 г.

Классификация антибиотиков на основе химического строения

1 Углеводные антибиотики	Аминогликозиды	Стрептомицин (медицина), казугамицин (фунгицид на рисовых плантациях)
2 Макроциклические лактоны	Макролидные, полиеновые антибиотики, ансамицины	Эритромицин (медицина), пимарин (сыроварение), рифампицин (лечение туберкулеза)
3 Семейство хинона	Тетрациклины Антрациклины	Тетрацилин, хлортетрацилин (медицина, консервант для пищевых продуктов) Доксорубин (противоопухолевая терапия)
4 Аминокислотные и пептидные антибиотики	Производные аминокислот β -Лактамные антибиотики Пептидные антибиотики Хромопептиды Гликопептиды	Циклоспорин (трансплантация органов), фосфинотрицин (растениеводство) Пенициллин, цефалоспорин (медицина), бацитрацин (медицина), виргиниамин (откорм скота) Актиномицин (противоопухолевая терапия) Блеомицин (противоопухолевая терапия), ванкомицин (медицина), авопарцин (скотоводство)
5 N-Содержащие гетероциклические соединения	Нуклеозидные антибиотики	Полиоксины, бластицидин S (фунгицид в растениеводстве)
6 O-Содержащие гетероциклические соединения	Полиэфирные антибиотики	Монезин (птицеводство)
7 Алициклические антибиотики	Производные циклоалканов	Циклогексимид (фунгицид)
8 Ароматические антибиотики	Производные бензола	Хлорамфеникол (медицина), гризеофульвин (фунгицид)

Мишени действия антибиотиков



Антибиотики: получение. Устойчивость к антибиотикам

СКРИНИНГ. Скрининг бактериальных штаммов с целью выявления антимикробной активности осуществляют по их влиянию на поведение контрольного штамма. После того как на штамме выявлена антимикробная активность, антибиотик выделяют, очищают и анализируют его структуру. Как правило, у нового антибиотика строение молекулы похоже на строение уже изученных веществ. Чтобы увеличить эффективность поиска штаммов-продуцентов антибиотиков, разрабатывают новые методы скрининга, например с использованием биохимических или биологических чипов, применяют новые химико-аналитические методы, а также ищут возможные мишени для действия антибиотика (в библиотеках синтезированных соединений ищут вещества, действующие на определенную функцию микроорганизма).

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ШТАММОВ. Антибиотики являются продуктами вторичного обмена веществ у микроорганизмов и выделяются в среду роста в очень небольших количествах (несколько миллиграммов на литр культуральной жидкости). Поэтому, если обнаруженный антибиотик представляет интерес, то перед исследователем встает задача повысить уровень его синтеза. Усовершенствование штамма заключается в многократном повторении актов мутагенеза с последующей селекцией и обратным «скрещиванием». Таким образом удается повысить выход антибиотика в 10^3 – 10^6 раз по сравнению с диким штаммом. Методы генетической инженерии, например, введение дополнительных копий генов ферментов, играющих ключевую роль в синтезе антибиотиков, также позволяют получать новые штаммы-суперпродуценты.

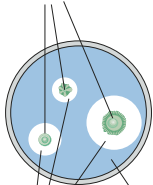
ФЕРМЕНТАЦИЯ И ПЕРЕРАБОТКА. У большинства антибиотиков весьма сложная структурная формула, часто с несколькими стереоцентрами, поэтому химический синтез редко используется для их производства. Промышленное получение антибиотиков осуществляется ферментацией в биореакторах. Питательная среда содержит такие недорогие источники углерода и азота, как меласса, лактоза и соевая мука. По мере замедления роста из-за исчерпания питательных веществ клеточная культура переходит в идиофазу: именно тогда синтезируются антибиотики. Большинство штаммов-продуцентов антибиотиков устойчивы к своим катаболитам только в этом состоянии, поэтому для предотвращения самоуничтожения система должна быстро достичь идиофазы, а затем культивировать микроорганизмы в этой фазе. Если в качестве продуцента антибиотиков используют грибы, или актиномицеты, наряду с оптимизацией состава питательной среды особое внимание уделяют концентрации кислорода, так как клетки мицелия весьма чувствительны к азрации. Образование антибио-

тов — продуктов вторичного обмена веществ — начинается после того, как клетки достигли стационарной фазы роста. Как правило, антибиотики являются внеклеточными продуктами аэробного обмена веществ и плохо растворяются в воде. По окончании цикла ферментации клетки удаляют центрифугированием, из среды экстрагируют растворенные в ней питательные вещества (эти два этапа выделения продукта можно объединять), а затем продукт очищают перекристаллизацией или хроматографически. Промышленные процессы получения, очистки и подготовки антибиотиков, которые используются в медицинских целях, ведутся под строгим контролем в полном соответствии с сертифицированными правилами организации производства и контроля качества лекарственных средств (Good Manufacturing Practice, ISO 9000).

УСТОЙЧИВОСТЬ (РЕЗИСТЕНТНОСТЬ) К АНТИБИОТИКАМ. Микроорганизмы, обладающие устойчивостью к антибиотикам, весьма распространены, и это стало главной медицинской проблемой. Неуклонно растет число штаммов *Salmonella*, *Escherichia coli*, стафилококков, стрептококков, а в последнее время и *Mycobacterium tuberculosis* (возбудитель туберкулеза), устойчивых к целому ряду антибиотиков. Самые важные механизмы, обеспечивающие устойчивость микроорганизма к действию антибиотиков, следующие: а) нарушение процесса поступления антибиотика в клетку или ускоренное выведение его из клетки (например, в результате изменения проницаемости мембраны); б) специфические изменения структур, являющихся мишенью действия антибиотика (изменения сайта связывания в рибосоме или молекуле ДНК); в) генетически запрограммированные ферментативные реакции, обеспечивающие устойчивость к антибиотику. Некоторые генетические дефекты могут распространяться среди различных видов микроорганизмов с помощью плазмид, фагов или транспозонов. Таким образом, после обнаружения нового антибиотика надо продолжить исследования, чтобы найти его аналоги на основе существующих антибиотиков, применяемых, например, в сельском хозяйстве для улучшения роста и профилактики заболеваний скота. Такие аналоги понадобятся для борьбы с патогенами, устойчивыми к действию существующих антибиотиков.

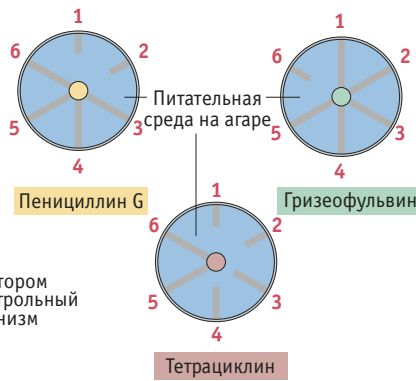
Скрининг и отбор

Плесневые грибы, синтезирующие антибиотик



Замедленный рост контрольного микроорганизма

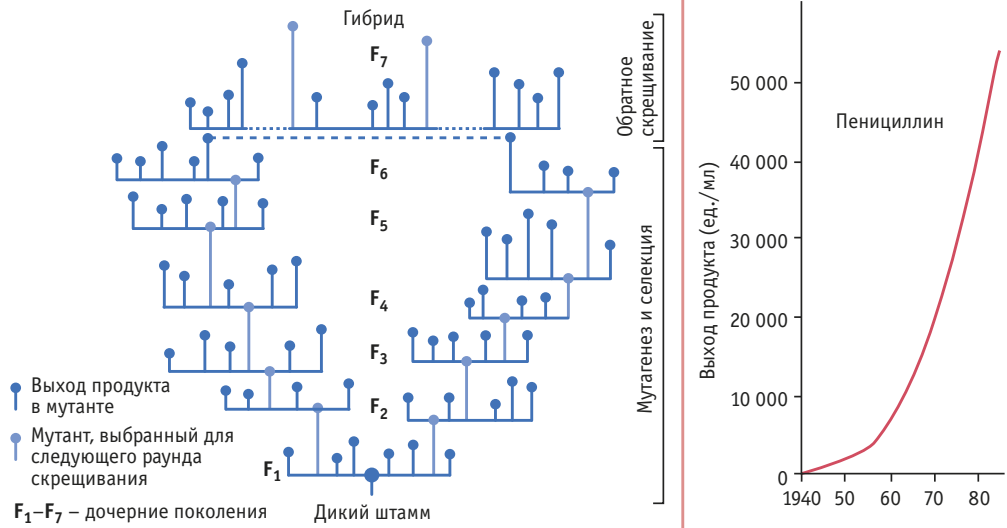
Агар, на котором растет контрольный микроорганизм



Пробы микроорганизмов (мазки):

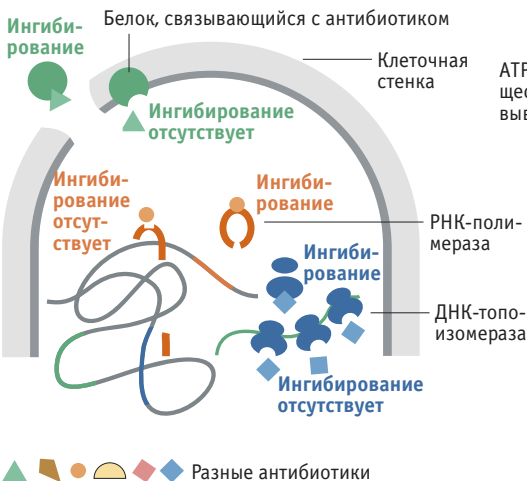
- 1 *Staphylococcus aureus* (грамположительная бактерия)
- 2 *Streptococcus sp.* (грамположительная бактерия)
- 3 *Escherichia coli* (грамотрицательная бактерия)
- 4 *Pseudomonas aeruginosa* (грамотрицательная бактерия)
- 5 *Candida albicans* (дрожжи)
- 6 *Trichophyton rubrum* (грибы)

Усовершенствование штаммов

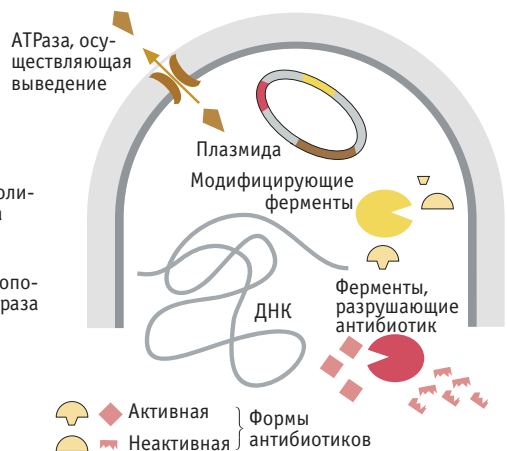


Устойчивость к антибиотику

а Изменение мишени действия антибиотика



б Ферментативные модификации или выведение антибиотика из клетки



β -Лактамные антибиотики: структура, биосинтез и механизм действия

ВВЕДЕНИЕ. Благодаря высокой эффективности действия, низкой токсичности, а также наличию разработанных методов химического и ферментативного получения β -лактамные антибиотики (производные пенициллина и цефалоспорины) нашли наиболее широкое применение в современной медицине. Мировое производство β -лактамных антибиотиков составляет 30 000 т, а около 50% всего рынка антибиотиков приходится на долю цефалоспорины. В то время как цефалоспорины используются только для лечения человека, пенициллин применяют и в ветеринарии. Наиболее важными веществами, из которых получают полусинтетические β -лактамные антибиотики, являются пенициллин G (бензилпенициллин) и цефалоспорины C. При внесении изменений в молекулярную структуру этих антибиотиков меняются фармакологические свойства и расширяется спектр действия нового антибиотика. Важными характеристиками антибиотиков являются их стабильность в кислых условиях среды (в желудочно-кишечном тракте – при пероральном введении), а также устойчивость к действию β -лактамазы – основного фермента, который обеспечивает резистентность бактерий к действию антибиотиков. Как правило, ген β -лактамазы находится в плазмидной ДНК бактерий.

ПЕНИЦИЛЛИН. Грибы вида *Penicillium chrysogenum* продуцируют изопенициллин N, имеющий в боковой цепи L- α -аминоадипиновую кислоту. Добавление к среде роста веществ-предшественников, ацильная группа которых участвует в реакции трансацилирования, позволяет получать производные пенициллина, обладающие различными фармакологическими свойствами. Так, в присутствии фенилуксусной кислоты образуется пенициллин G. Это вещество и получаемая из него 6-аминопенициллановая кислота (6-APA) – важнейшие промежуточные продукты при производстве полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов.

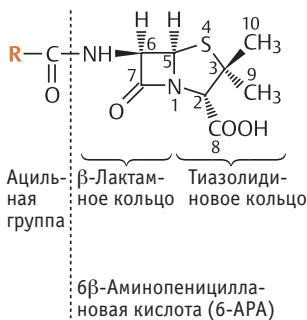
ЦЕФАЛОСПОРИН. Цефалоспорины C были впервые описаны в 1953 г. как новый ряд β -лактамного антибиотика, образующегося в *Acremonium chrysogenum* (ранее *Cephalosporium acremonium*). *A. chrysogenum* не имеет собственной N-трансацилилазы, поэтому, в отличие от биосинтеза пенициллинов, в этом случае нет возможности обеспечить биосинтез новых фармакологических продуктов добавлением в среду роста тех или иных веществ. Полусинтетические цефалоспорины получают двумя способами: из 7-аминоцефалоспориновой кислоты (7-ACA), которая образуется при удалении амидной боковой цепи цефалоспорины C, и ее 3-дезацетоксипроизводного (7-ADCA). В настоящее время существует уже три поколения цефалоспоринов, различающиеся по специфичности действия. Цефалоспорины второго и

третьего поколения имеют широкий спектр действия, включающий и грамположительные, и грамотрицательные бактерии, и практически не вызывают побочных эффектов у пациентов.

БИОСИНТЕЗ. В геноме *P. chrysogenum* найдены три гена, продукты которых участвуют в биосинтезе изопенициллина N. Эти гены расположены рядом друг с другом и образуют так называемый генный кластер. Продукт одного из этих генов – синтетазы – обеспечивает присоединение L-валина и L-цистеина к L- α -аминоадипиновой кислоте. Образовавшийся трипептид под действием другой синтетазы превращается в изопенициллин N, содержащий β -лактамное кольцо. На следующем этапе происходит обмен боковой цепи (L- α -аминоадипила) на другие ацильные группы. Эту реакцию катализирует ацил-КоА:изопенициллин-N-ацилтрансфераза. Для получения цефалоспоринов осуществляют расширение гетероцикла изопенициллина N при участии фермента экспансазы. O-Ацилтрансфераза, выделенная из *A. chrysogenum*, модифицирует только 3-ацетоксиметильную группу, не затрагивая N-ациламиногруппу. У *A. chrysogenum* (в отличие от *P. chrysogenum*) гены, продукты которых участвуют в биосинтезе цефалоспорины C, расположены на двух различных хромосомах. Эти гены уже клонированы, и ведутся исследования с целью осуществления направленной (искусственной) регуляции биосинтеза антибиотиков.

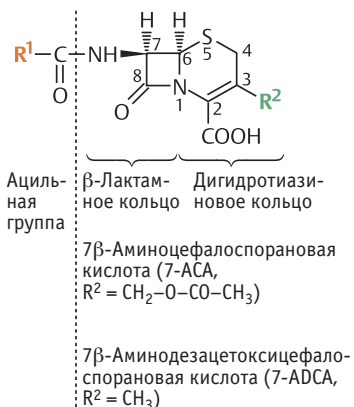
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ β -ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ. β -Лактамные антибиотики препятствуют образованию поперечных пептидных связей в молекуле мурина – основного компонента клеточных стенок бактерий. Таким образом, антибиотики этой группы действуют на микроорганизмы, содержащие в клеточной стенке мурина. Для человека нежелательные побочные эффекты от приема антибиотиков связаны с возможными нарушениями баланса кишечной флоры и возникновением аллергических реакций.

Пенициллин



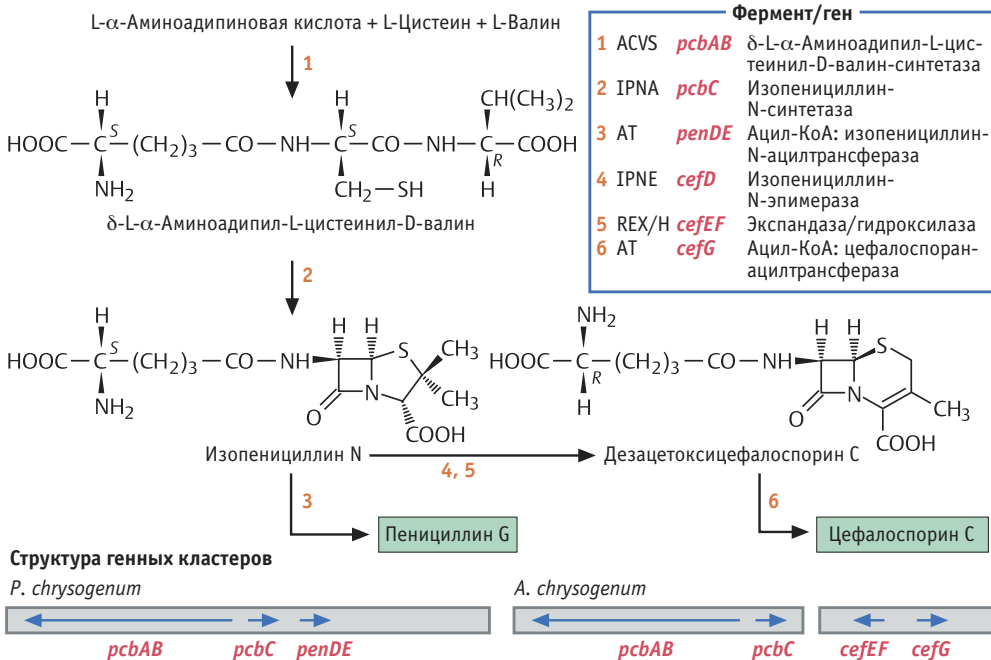
R	Название	Свойства
$\text{HOOC}-\overset{(S)}{\text{C}}\text{H}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_3-$	Изопенициллин N	
$\text{H}_5\text{C}_6-\text{CH}_2-$	Пенициллин G	Неустойчив в кислой среде, чувствителен к β -лактамазе
$\text{H}_5\text{C}_6-\overset{(R)}{\text{C}}\text{H}(\text{NH}_2)-$	Ампициллин	Устойчив в кислой среде, чувствителен к β -лактамазе, действует также на грамотрицательные бактерии
$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{(R)}{\text{C}}\text{H}(\text{NH}_2)-$	Амоксициллин	Устойчив в кислой среде, чувствителен к β -лактамазе, широкий спектр действия, высокая степень резорбции

Цефалоспорины



R ¹ /R ²	Название	Свойства
$\text{HOOC}-\overset{(R)}{\text{C}}\text{H}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_3-$	Цефалоспорин С	Неустойчив в кислой среде, чувствителен к β -лактамазе
$\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_3$		
$\text{H}_5\text{C}_6-\overset{(R)}{\text{C}}\text{H}(\text{NH}_2)-$	Цефаклор	Устойчив в кислой среде, не чувствителен к β -лактамазе, широкий спектр действия
Cl		
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2\text{S}-\text{C}(=\text{N}-\text{OCH}_3)$ (syn)	Цефотаксим	Устойчив в кислой среде, не чувствителен к β -лактамазе, очень широкий спектр действия
$\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_3$		

Биосинтез и структура генных кластеров



β-Лактамные антибиотики: промышленное получение

ВВЕДЕНИЕ. В молекуле пенициллина в гетероцикле три стереоспецифических центра, следовательно, при химическом синтезе могут образовываться восемь стереоизомеров (3(S):5(R):6(R)), из которых лишь один стереоизомер проявляет биологическую активность. По сравнению с химическим синтезом ферментация с использованием оптимизированных штаммов *Penicillium chrysogenum* представляется значительно более выгодной с экономической точки зрения. Добавление в среду роста алифатических или ароматических карбоновых кислот позволяет получать различные производные – предшественники других антибиотиков, среди которых наибольшее значение имеют пенициллины V и G. Пенициллин G используется для производства 6-аминопенициллановой кислоты (6-АРА) – важнейшего продукта при получении полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов.

ПЕНИЦИЛЛИН G И 6-АМИНОПЕНИЦИЛЛАНОВАЯ КИСЛОТА (6-АРА). В промышленности при получении пенициллина G используют штаммы-суперпродуценты *P. chrysogenum*, культуру которых выращивают в биореакторах с рабочим объемом до 200 м³. Чтобы избежать подавления роста клеток катаболитами, ферментацию осуществляют в непрерывном режиме, т. е. в биореактор постоянно подают свежую культуральную среду. Для образования и роста мицелия грибов необходимо хорошее снабжение кислородом, поэтому в ферментерах предусмотрены специальные приспособления для аэрации и тщательного перемешивания культуры. Сложная питательная среда содержит лактозу в качестве источника углерода, а жидкий кукурузный экстракт служит источником азота. Синтез антибиотиков начинается примерно через 40 ч, т. е. по окончании фазы роста. Идиофаза – период, когда происходит синтез антибиотиков, – длится около 100 ч, и в это время в среду добавляют фенилуксусную кислоту. Клетки секретируют пенициллин G в культуральный бульон. После отделения мицелия фильтрацией или центрифугированием культуральную жидкость подвергают двухстадийной экстракции с использованием амилацетата (или бутилацетата) при pH 2,5–3,0 и 0–3 °С. Метод основан на том, что большинство антибиотиков хорошо растворяются в органических растворителях, практически не смешивающихся с водой. Непрерывную экстракцию антибиотика из водной фазы в органическую можно осуществлять в противоточном режиме, при котором две жидкие фазы движутся в противоположных направлениях. Затем первичный продукт (около 3 т/сут. в биореакторе с объемом 110 м³) перекристаллизовывают. Следующий этап переработки заключается в гидролизе пенициллина G с образованием 6-АРА – важнейшего соединения, необходимого

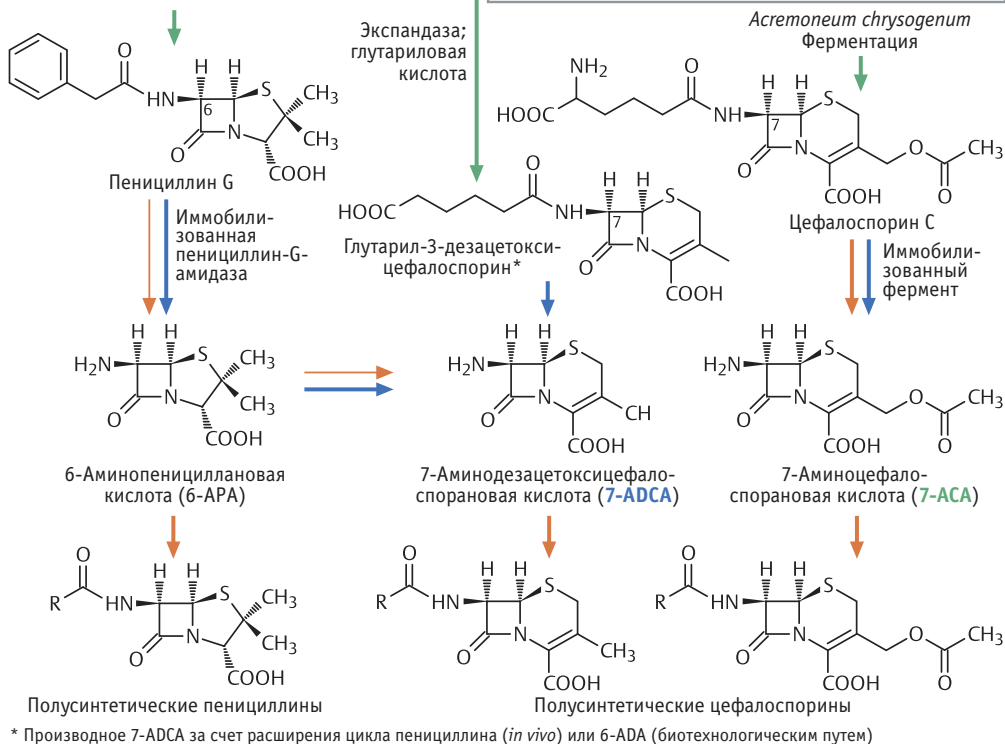
для производства полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов. В современном производстве химический гидролиз практически полностью заменен на ферментативный гидролиз под действием иммобилизованной пенициллин-G-амидазы из *E. coli*. Оптимальными условиями для реакции гидролиза являются pH 7,5–8,0 и температура 35–40 °С. Высокая стабильность фермента позволяет повторять цикл до 1000 раз, поэтому реакцию проводят в непрерывном режиме. В результате последующей очистки продукта осаждением и фильтрацией получают 6-АРА высокой степени чистоты, а затем ее либо подвергают ацилированию по положению 6 для получения полусинтетических пенициллинов, либо превращают в 7-ADCA – промежуточное соединение в синтезе цефалоспоринов.

ЦЕФАЛОСПОРИНЫ И 7-ADCA. Метод ферментативного получения цефалоспоринов с использованием *Acremonium chrysogenum* аналогичен описанному выше способу производства пенициллинов, однако в случае цефалоспоринов выход продукта несколько ниже. *A. chrysogenum* не имеет собственной N-транс-ацетилазы, поэтому все полусинтетические антибиотики ряда цефалоспоринов синтезируют на основе 7-аминоспоровановой кислоты (7-ACA) или ее дезацетоксипроизводного (7-ADCA). 7-ACA получают путем гидролиза в мягких условиях. По экономическим и экологическим причинам все большее распространение приобретает двухстадийный процесс. Получение 7-ACA начинается с иммобилизованной оксидазы D-аминокислот. На этой стадии путем окислительного дезаминирования образуется α-кетоадипил-7-ACA, которая спонтанно декарбоксилируется до глутарил-7-ACA. В ходе реакции, катализируемой иммобилизованной глутарил-7-ACA-ацилазой, образуется 7-ACA. Из нее можно получить до 50 полусинтетических цефалоспоринов. Одностадийный гидролиз осуществляют с использованием цефалоспорин-7-ацилазы. Для получения 7-ADCA и производных цефалоспоринов используют рекомбинантные штаммы *Penicillium chrysogenum*, в которых клонирован ген экспандазы из *Acremonium chrysogenum* или *Streptomyces clavuligerus*. Образующаяся адипил-ADCA расщепляется амидазой (например, из *Pseudomonas diminuta*). Расширение кольца пенициллина до дезацетоксицефалоспоринона также возможно во внеклеточных условиях с использованием иммобилизованных ферментов.

Методы синтеза

Penicillium chrysogenum
На среде с фенилуксусной кислотой

→ Ферментация → Дополнительные химические реакции
→ Ферментативный катализ



Промышленное получение β-лактамных антибиотиков

Антибиотики пенициллинового ряда

Посевной материал
Суспензия спор *P. chrysogenum*

Предферментация, ферментация
Лактоза, жидкий кукурузный экстракт, CaCO₃; ферментация с добавлением субстрата (глюкозы), усиленное снабжение кислородом; добавление веществ-предшественников, например D-фенилуксусной кислоты, приводит к образованию биосинтетических пенициллинов; выход: > 30 г/л после 120 ч ферментации

Первичная обработка
1) Отделение мицелия
2) Экстракция в противотоке с использованием амилацетата или бутилацетата

Ферментативный гидролиз с образованием 6-АРА
Иммобилизованная пенициллин-G-амидаза из *E. coli*, в непрерывном режиме, при 37 °С

Полусинтетические пенициллины
Присоединение ацильных боковых групп (реакция Шоттена–Баумана)

Антибиотики цефалоспоринового ряда

Посевной материал
Суспензия спор *A. chrysogenum*

Предферментация, ферментация
Ферментация с добавлением субстрата, усиленное снабжение кислородом в течение 120 ч; добавление жирных кислот, например метилолеата, приводит к повышению выхода продукта; > 17 г/л после 150 ч ферментации

Первичная обработка
1) Отделение мицелия
2) Ионнообменная хроматография, осаждение или адсорбция на амберлите XAD

Химический гидролиз с образованием 7-АСА
Иммобилизованные оксидаза D-аминокислот и глутарил-7-АСА-ацилаза, выход > 90%

Полусинтетические цефалоспорины
Присоединение ацильных боковых групп (реакция Шоттена–Баумана)

Пептидные антибиотики и антибиотики – производные аминокислот

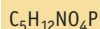
ВВЕДЕНИЕ. В предыдущем разделе обсуждались методы получения β-лактамных антибиотиков – важнейшей группы антибиотиков, применяемых в медицине. В настоящее время продемонстрировано антимикробное действие более 500 веществ, состоящих из пептидов или являющихся производными аминокислот. Некоторые из этих соединений используются в медицине, в частности для стимуляции заживления ран, а другие нашли применение в сельском хозяйстве. К этой группе антибиотиков относятся циклосерин, фосфинотрицин, циклические пептидные антибиотики (граммицидин, бацитрацин), хелатообразующие пептиды (блеомицин), хромолептиды (актиномицин), а также депсипептиды (виргиниамицин). Большинство этих соединений получают из клеток стрептомицетов, а некоторые – из других грамположительных микроорганизмов, в том числе стрептококков и бацилл.

АНТИБИОТИКИ – ПРОИЗВОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТ. Образующийся в процессе жизнедеятельности *Streptomyces orchidaceus* D-циклосерин представляет собой аналог D-аланина – вещества, входящего в состав муреина клеточной стенки бактерий. Антибактериальное действие D-циклосерина заключается в ингибировании аланинрацемазы, участвующей в синтезе муреина. В отличие от многих других антибиотиков D-циклосерин действует на *Mycobacterium tuberculosis*, поэтому в сочетании с рифампицином он показан при лечении туберкулеза легких (замечим, что в Западной Европе в последние годы туберкулез почти не встречается). Аланил-аланил-фосфинотрицин, выделенный из *Streptomyces hygroscopicus*, является аналогом L-глутамин и ингибирует глутаминсинтетазу растений. Промышленное получение фосфинотрицина (Glyphosat®, Vasta®) основано на химическом синтезе этого соединения. Клонирование гена ацетилтрансферазы из *S. hygroscopicus* в сельскохозяйственных растениях обеспечивает устойчивость трансгенных растений к фосфинотрицину.

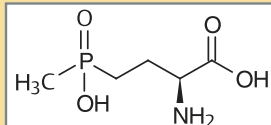
ПЕПТИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ. Пептидные антибиотики синтезируются как на рибосомах, так и вне их. Синтез на рибосомах приводит к образованию линейных полипептидов, которые подвергаются посттрансляционным модификациям. Примером такой модификации может служить реакция эпимеризации – превращение L-аминокислоты в D-аминокислоту. Так, *низин* – пептидный антибиотик, образующийся на рибосомах в клетках некоторых штаммов молочнокислых бактерий. Его антимикробное действие заключается в ингибировании образования цитоплазматической мембраны грамотрицательных бактерий, поэтому препарат низина используют в производстве кисломолочных продуктов в качестве консервирующего средства, препятствующего росту других микро-

организмов. Нерибосомный синтез пептидов возможен благодаря функционированию специальных ферментных комплексов – синтетаз, по строению сходных с синтетазой жирных кислот у эукариот. В этих ферментативных реакциях образуются короткие линейные полипептиды, которые затем замыкаются в цикл, образуя, например, лантибиотики. Размер таких пептидов, как правило, не превышает 20 аминокислотных остатков. Они формируют в фосфолипидной мембране каналы, проницаемые для катионов. Кроме того, в их состав часто входят небелковые аминокислоты, а также дополнительные структурные элементы. Большинство пептидных антибиотиков, синтезированных вне рибосом, являются сильными токсинами, поэтому они применяются лишь для специальных целей, например для заживления ран или ожогов. *Бацитрацин* применяется в качестве кормовой добавки; *циклоспорин* из *Tolypocladium inflatum* – иммуносупрессор (назначается при трансплантации органов). *Колистин* (полимиксин E) из клеток *Bacillus polymyxa* иногда используется как антибактериальный препарат при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Цитостатик *блеомицин*, образующийся в клетках *Streptomyces verticillus*, относится к важным препаратам противораковой терапии. Блеомицин в комплексе с Fe^{2+} способен действовать в качестве ДНКазы, т. е. осуществлять разрывы в двуцепочечной ДНК. *Актиномицин*, синтезирующийся многими штаммами *Streptomyces*, узнает в молекуле ДНК палиндромную последовательность 5'-TGAC-3' и взаимодействует с ней, блокируя трансляцию ДНК, и в результате останавливает транскрипцию (при высоких концентрациях – репликацию). Ранее актиномицин использовался в противораковой терапии. В антибиотиках группы *депсипептидов*, действующих на грамположительные бактерии, аминокислотные остатки соединены между собой поочередно эфирными и амидными связями. Один из представителей этого ряда препаратов виргиниамицин – продукт жизнедеятельности *Streptomyces virginiae* и широко применяется при откорме скота и в птицеводческом хозяйстве. Ряд *сидерохромов* представлен пептидными антибиотиками, содержащими ионы железа и гидроксамовую кислоту. Они используются при лечении заболеваний, связанных с нарушениями обмена железа.

Антибиотики – производные аминокислот



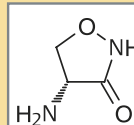
M_R 181,13
Код CAS 35597-44-5
(S)-Форма



Фосфинотрицин

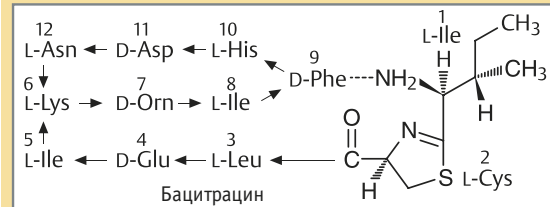


M_R 102,09
Код CAS 68-41-7



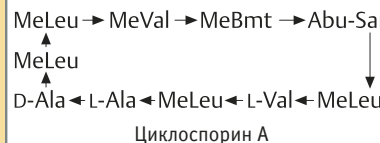
Циклосерин

Циклические пептидные антибиотики



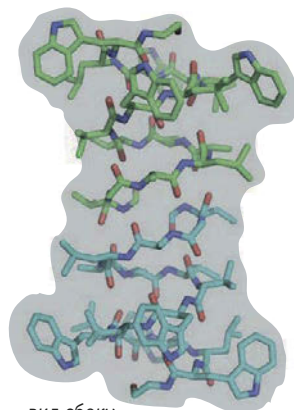
$C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$
хорошо растворим в воде

M_R 1422,71
Код CAS 1405-87-4



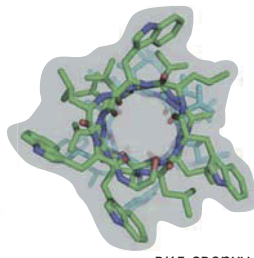
$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$
 M_R 1202,63 Код CAS 59865-13-3

Abu L-Аминомасляная кислота
Sar Саркозин
MeBmt Бутенилдиметилтреонин
MeLeu N-Метиллейцин



вид сбоку

Грамицидин А,
А- и В-цепи
в фосфолипидной
мембране (1MAG)



вид сверху

Антибиотик	Метод получения
Фосфинотрицин	В основном химический синтез
Бацитрацин А	<i>Bacillus licheniformis</i>
Полимиксин	<i>Bacillus polymyxa</i>
Грамицидин	<i>Bacillus sp.</i>
Блеомицин	<i>Streptomyces verticillus</i>
Циклоспорин	<i>Tolypocladium inflatum</i>
Виргиниамицин	<i>Streptomyces virginiae</i>
Валиномицин	<i>Streptomyces fulvisimus</i>

Ферментация (производство бацитрацина):

Предферментация

Реактор 1–3 м³,
6 ч при 37 °С

Биореактор

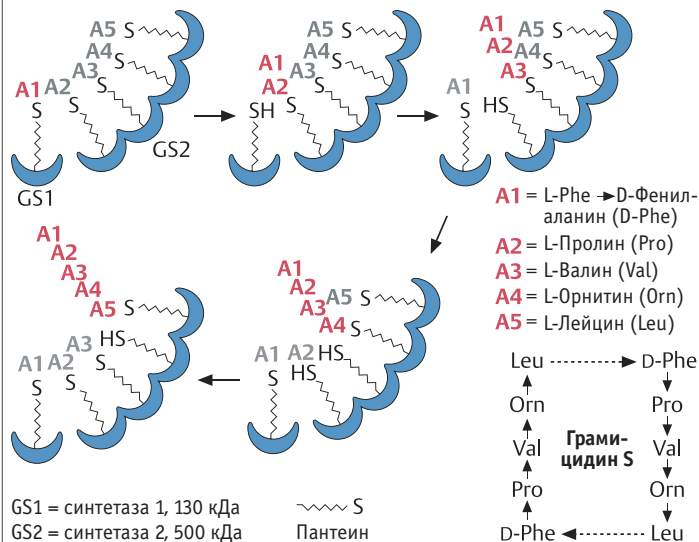
Около 100 м³, 30 ч при
7 °С, сахара, отходы
переработки сои, соли

Обработка

Для медицинских целей:
экстракция 1-бутанолом,
ионообменная
хроматография;
Производство кормовой
добавки: высушивание
биомассы распылением

9 г/л за 30 ч

Биосинтез грамицидина S (*Bacillus brevis*)



Гликопептидные, полиэфирные и нуклеозидные антибиотики

ВВЕДЕНИЕ. Здесь мы рассмотрим следующие антибиотики: гликопептидный антибиотик ванкомицин, который активен против штаммов *Staphylococcus aureus*, устойчивых к действию метициллина; его аналог авопарцин, применяемый в качестве кормовой добавки; гликозид линкомицин, очень эффективно действующий против грамположительных энтеробактерий; а также монензин, который используют на птицефабриках для профилактики инфекций, вызываемых простейшими. Несмотря на то что нуклеозидные антибиотики – природные соединения, в медицине используются только продукты химического синтеза. В качестве примера нуклеозидного антибиотика здесь рассмотрен ацикловир – аналог гуанозина, применяемый для лечения вирусного менингита.

ВАНКОМИЦИН И АВОПАРЦИН. Ванкомицин, продуцентом которого является *Amycolatopsis orientalis*, применяется в борьбе с энтерококковыми бактериями, устойчивыми к действию пенициллина, например при септическом эндокардите. Этот антибиотик часто используется для лечения пациентов, страдающих аллергией на β -лактамы антибиотики. Ванкомицин оказывает негативное действие на почки, поэтому при лечении этим антибиотиком необходимо следить за функцией почек. Как и в случае β -лактамов антибиотиков, действие ванкомицина на микроорганизмы заключается в ингибировании образования клеточной стенки бактерий в результате связывания антибиотика с UDP-мурамилпентапептидом. В штаммах, устойчивых к действию ванкомицина, реализуется путь синтеза клеточной стенки с другими промежуточными продуктами, не вступающими в реакцию с этим антибиотиком. Устойчивость к антибиотику, возможно, возникает в результате горизонтального переноса генетической информации посредством транспозонов между людьми, а также домашними животными. Авопарцин – продукт жизнедеятельности *Streptomyces candidus*, по структуре очень близкий к ванкомицину – в странах ЕС применяется в качестве кормовой добавки. Эксперименты на изолированных транспозонах, обеспечивающих устойчивость к ванкомицину и авопарцину, показали, что, возможно, в организме человека штаммы энтеробактерий, устойчивые к действию этих антибиотиков, возникают по такому же механизму передачи генетической информации. По этой причине в некоторых странах (например, в Дании) авопарцин был запрещен; согласно клиническим наблюдениям, случаи резистентности к ванкомицину стали реже.

ЛИНКОМИЦИН – антибиотик, образующийся в *Streptomyces lincolnensis* и действующий против грамположительных бактерий. Основное применение линкомицина связано с ветеринарией. Механизм действия

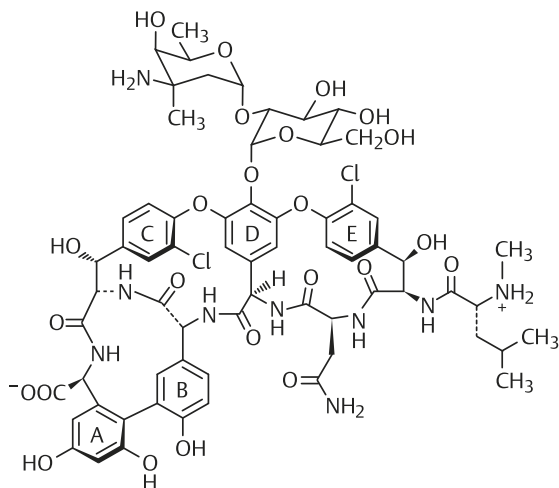
этого антибиотика сходен с действием хлорамфеникола: линкомицин связывается с 50S-субъединицей прокариотической рибосомы и препятствует дальнейшему росту пептидной цепи. К настоящему времени зарегистрировано множество штаммов, обладающих устойчивостью к линкомицину. В таких клетках линкомицин либо подвергается ферментативному разрушению, либо в результате метилирования происходят такие изменения рРНК, что линкомицин не взаимодействует с 50S-субъединицей прокариотической рибосомы.

МОНЕНЗИН – полиэфирный антибиотик, который получают в процессе ферментации, осуществляемой *Streptomyces cinnamonensis*. Путь биосинтеза монензина аналогичен синтезу поликетидных антибиотиков из ацетата, пропионата и бутирата. Молекулы монензина встраиваются в мембрану и функционируют как ионофоры: они обеспечивают поступление ионов Na^+ в клетку и таким образом вызывают осмотический лизис клетки. Такой механизм объясняет чрезвычайно широкий круг организмов, для которых действие монензина является токсичным: к ним относятся не только бактерии и грибы, но и простейшие, например *Eimeria sp.* и *Toxoplasma sp.*, вызывающие заболевания на птицефермах. Из-за высокой токсичности монензин не используется в медицине, однако находит широкое применение в качестве кормовой добавки при разведении кур и крупного рогатого скота. На долю монензина и его структурного аналога салиномицина приходится до 80% объема мирового рынка антибиотиков. Производство монензина превышает 3000 т/год, а рыночный оборот составляет 200 млн долл. США.

НУКЛЕОЗИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ. Нуклеозидные антибиотики пока находят лишь ограниченное применение. Аналог цитозина, бластицидин S, образующийся в *Streptomyces griseochromogenes*, используют при выращивании риса в качестве фунгицида, препятствующего возникновению мучнистой росы. Действие бластицидина S основано на ингибировании связывания аминоксил-тРНК с рибосомой. В лечении заболеваний, вызванных вирусами герпеса, таких как энцефалит, важная роль принадлежит ацикловиру – синтетическому аналогу гуанозина.

Гликопептидные, гликозидные и нуклеозидные антибиотики

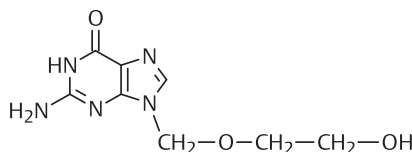
а Ванкомицин



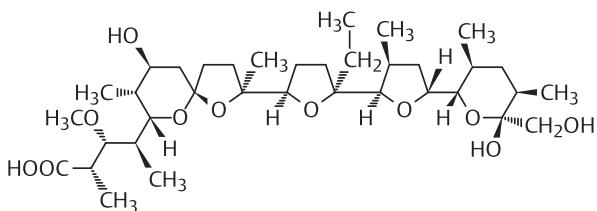
б Бластицидин S



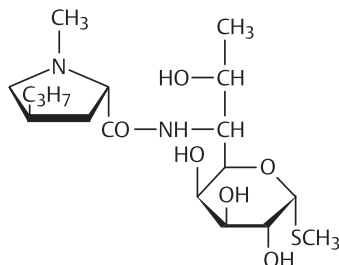
в Ацикловир



г Монензин А



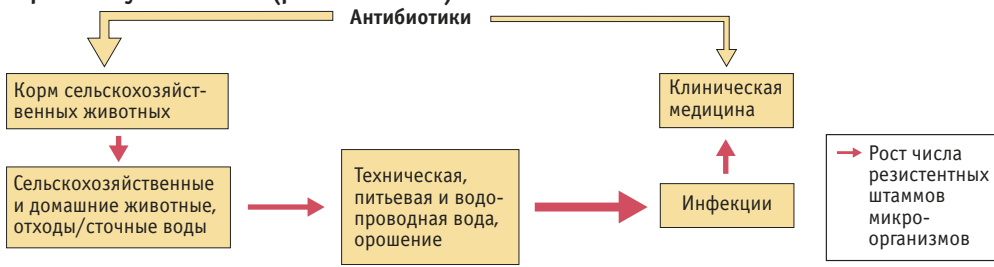
д Линкомицин



	а	б	в	г	д
M_R	$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$	$C_{17}H_{26}N_8O_5$	$C_8H_{11}N_5O_3$	$C_{36}H_{62}O_{11}$	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$
Код CAS	1449,27	422,44	225,21	670,90	406,56
Код CAS	1404-90-6	2079-00-7	59277-89-3	17090-79-8	154-21-2

Антибиотик	Микроорганизмы, используемые при ферментации	Объем мирового рынка	Применение
Ванкомицин	<i>Amycolatopsis orientalis</i>		Медицина
Авопарцин	<i>Streptomyces candidus</i>		Кормовая добавка
Монензин	<i>S. cinnamonensis</i>	Более 3000 т в год, 200 млн долл. США	Профилактика протозойных инфекций у кур
Бластицидин S	<i>S. griseochromogenes</i>		Защита растений от грибковых инфекций (фунгицид)
Ацикловир	Химический синтез		Медицина: противовирусный препарат
Линкомицин	<i>S. lincolnensis</i>		Ветеринария

Проблема устойчивости (резистентности) к антибиотикам



Аминогликозидные антибиотики

ВВЕДЕНИЕ. Открытие стрептомицина, сделанное Зельманом Ваксманом в 1943 г., явилось важной вехой в изучении антибиотиков. Этот препарат был впервые успешно применен для лечения туберкулеза, вызываемого *Mycobacterium tuberculosis*, — одного из широко распространенных и наиболее опасных заболеваний человека. Стрептомицин, как и большинство аминогликозидных антибиотиков, оказывает различные побочные эффекты, связанные с нарушениями слуха и работы почек, поэтому в настоящее время для лечения туберкулеза используют другие антибиотики (гидразид изоникотиновой кислоты, рифампицин, а ранее часто применяли циклосерин). Молекулы аминогликозидных антибиотиков состоят из кольца аминоциклитола (например, 2-дезоксистрептамин), которое связано с другими остатками аминокислот гликозидными связями. Аминогликозидные антибиотики, как правило, имеют широкий спектр действия, в том числе они эффективны против грамотрицательных бактерий, поэтому несмотря на относительно высокую токсичность их широко используют в медицине, например при тяжелых инфекциях. Другой областью применения аминогликозидных антибиотиков является сельское хозяйство, где они служат для защиты растений. Объем рынка аминогликозидных антибиотиков достигает 800 млн долл. США в год. В медицинских целях наиболее важное значение имеют следующие антибиотики группы аминогликозидов: гентамицин, нетимицин, тобрамицин, позднее гентамицин, канамицин, полусинтетические продукты сизомицин и амикацин, а в специальных случаях — стрептомицин. Спектиномицин используют при лечении заболеваний, вызванных штаммами *Neisseria gonorrhoeae*, устойчивыми к пенициллину. Касугамицин применяют при выращивании риса для профилактики мучнистой росы, а гидромицин используют в ветеринарии.

БИОСИНТЕЗ. Большинство аминогликозидных антибиотиков образуются в прокариотических организмах — представителях *Streptomyces* и *Micromonospora*. Биосинтез аминогликозидных антибиотиков включает множество стадий (например, в случае стрептомицина их насчитывается 24), при этом D-глюкоза связывается с нуклеозидом, затем образуется аминоциклитольное кольцо, к которому через гликозидные связи присоединяются специфические сахара (C-разветвленные сахара, аминокислоты). В синтезе стрептомицина принимают участие 33 белка, гены которых образуют крупный генный кластер размером 30–40 т.п.н. на хромосоме *S. griseus*. Многие из этих генов клонированы.

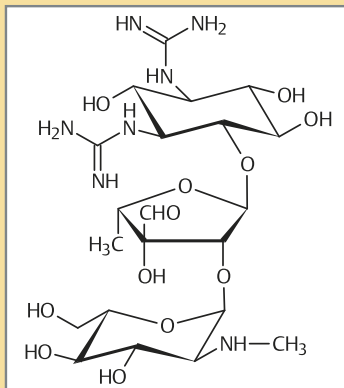
ПОЛУЧЕНИЕ. Для получения более высоких выходов аминогликозидных антибиотиков постоянно ведется работа по созданию новых штаммов. Так, в результа-

те многократного повторения раундов мутагенеза с последующим отбором мутантов удается повысить выход продукта, например стрептомицина: в диком штамме синтезируется несколько миллиграммов на литр, а в штаммах-суперпродуцентах выход антибиотика превышает 10 г/л после 120 ч роста. В промышленности для выращивания культуры используют биореакторы с большим рабочим объемом. В качестве источника углерода служат глюкоза, крахмал или декстрин, а источником азота — соевая мука. Аминогликозидные антибиотики, в частности гентамицин, выделяются в среду роста, после того как pH среды доведен до 2,0. После отделения клеточной массы следует концентрирование культуральной жидкости, из которой в дальнейшем методом ионообменной хроматографии получают очищенный антибиотик.

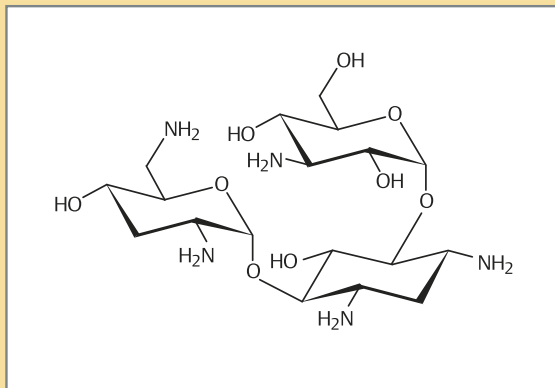
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ. Антимикробный эффект аминогликозидных антибиотиков объясняется тем, что их молекулы связываются с 30S-субъединицей прокариотической рибосомы и вызывают ошибки трансляции, приводящие к остановке синтеза полипептидных цепей. Некоторые антибиотики группы аминогликозидов специфически взаимодействуют с РНК интронов I группы. Недостаток аминогликозидных антибиотиков заключается в том, что микроорганизмы достаточно быстро вырабатывают механизм устойчивости к их действию. В результате ферментативного ацетилирования, фосфорилирования или аденилирования гидроксильных групп в структуре рибосомы, ее связывание с молекулами антибиотика нарушается. Ферменты, осуществляющие такие специфические модификации, закодированы в плазмиде или хромосоме микроорганизма.

ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ АМИНОГЛИКОЗИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ. Путем химических превращений аминокислот получают, как правило, полусинтетические аминогликозидные антибиотики (сизомицин, амикацин, тобрамицин). Несмотря на то что многие гены ферментов, участвующих в биосинтезе аминогликозидных антибиотиков, клонированы, в настоящее время синтез с использованием этих ферментов в промышленных масштабах экономически невыгоден. Это объясняется прежде всего чрезвычайно сложными механизмами регуляции активности ферментов биосинтеза.

Аминогликозидные антибиотики



Стрептомицин M_R 581,58
 $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ Код CAS 57-92-1

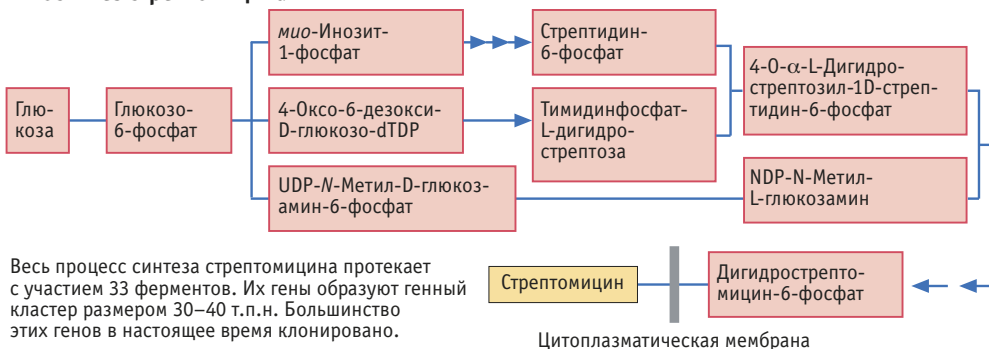


Тобрамицин M_R 467,51
 $C_{18}H_{37}N_5O_9$ Код CAS 32986-56-4

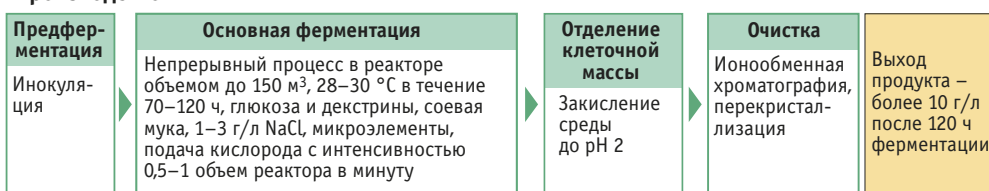
Антибиотик	Продуцент	Объем рынка в 2004 г. (млн долл. США)	Применение
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>		Антибиотик широкого спектра действия, в том числе против <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Тобрамицин	<i>S. tenebrarius</i>	220	Антибиотик широкого спектра действия
Гентамицин	<i>Micromonospora purpurea</i>		Антибиотик широкого спектра действия
Амикацин*	<i>S. kanamyceticus</i>	50	Антибиотик широкого спектра действия
Нетилмицин*	<i>M. purpurea</i>		Антибиотик широкого спектра действия
Неомицин	<i>S. fradiae</i>		Кожные инфекции
Касугамицин	<i>S. kasugaensis</i>		Используется при выращивании риса, действует против мучнистой росы
Валидамицин	<i>S. hygroscopicus</i>		Используется при выращивании риса

* Химическое производное

Биосинтез стрептомицина



Производство



Тетрациклины, хиноны, хинолоны и другие ароматические антибиотики

ВВЕДЕНИЕ. Благодаря широкому спектру действия антибиотиков группы тетрациклинов находят широкое применение как в медицине, так и в ветеринарии (2004 г.: 880 млн долл.). Производные налидиксовой кислоты (антибиотики ряда хинолонов) также обладают широким антимикробным спектром действия и после лактамных антибиотиков являются наиболее часто используемыми в современной медицине. Объем рынка хинолонов в 2004 г. превысил 5,8 млрд долл. США.

Тетрациклины. С тех пор как в 1945 г. впервые был описан хлортетрациклин, продукт жизнедеятельности *Streptomyces aureofaciens*, появилось множество производных тетрациклина. Для человека эти вещества слаботоксичны, но эффективно действуют против грамотрицательных и грамположительных бактерий, риккетсий, микоплазм, лептоспир, спирохет и некоторых крупных вирусов. Антимикробное действие антибиотиков тетрациклинового ряда основано на том, что они связываются с 70S-субъединицей прокариотической рибосомы и тем самым препятствуют синтезу белка. К сожалению, в некоторых странах неумеренное добавление этих антибиотиков в корма в птицеводстве и свиноводстве привело к появлению резистентных штаммов, число которых неуклонно растет. Наиболее часто механизм устойчивости к действию антибиотика заключается в изменении свойств внешней клеточной оболочки, в результате чего антибиотик не проникает внутрь клетки. Кроме того, в клетке могут синтезироваться так называемые тет-белки, которые осуществляют активный транспорт молекул антибиотика из клетки. Гены таких белков находятся в плаزمиде. Тетрациклины образуются в процессе жизнедеятельности стрептомицетов. Биосинтез включает более 70 реакций, в результате которых из глюкозы образуются поликетидные производные, в том числе окситетрациклин. В промышленности для получения тетрациклиновых антибиотиков клетки штаммов-суперпродуцентов культивируют в биореакторах с большим рабочим объемом. Для получения высоких выходов продукта (до 25 г/л) необходимо, чтобы в среде поддерживался высокий уровень кислорода, а концентрация фосфатов не превышала оптимального значения. После проведения ферментации клетки удаляют из культуральной жидкости, методом многоступенчатой экстракции *n*-бутилацетатом выделяют антибиотик, а затем очищают его посредством ионообменной хроматографии.

Антрациклины. Действие антрациклиновых гликозидов, например доксорубина (адриамицина), заключается в ингибировании ферментов-топоизомераз путем интеркаляции, что приводит к прекращению репликации ДНК. В клинической медицине эти препараты используют при лечении злокачественных опухолей. Промышленное получение антрациклиновых антибиотиков основано на ферментации.

Хинолоны. Бактерицидный эффект налидиксовой кислоты — промежуточного продукта химического синтеза антималярийного препарата хлороквина — был открыт еще в 1962 г., однако лишь в 1977 г. удалось показать, что механизм действия этого антибиотика заключается в ингибировании бактериальной топоизомеразы (гиразы А). Структуры прокариотической и эукариотической топоизомераз значительно отличаются, поэтому антибиотики ряда хинолонов не взаимодействуют с эукариотическим ферментом, а значит обладают низкой токсичностью для человека. Для хинолоновых антибиотиков характерен широкий спектр антимикробного действия: грамположительные и грамотрицательные бактерии, микобактерии, хламидии, анаэробные бактерии и др. Развитие резистентности у микроорганизмов может быть результатом модификаций гиразы или пониженной проницаемости клеточной мембраны для молекул антибиотика. Поскольку гены, ответственные за возникновение такой резистентности, находятся в хромосоме, а не в плазмиде, образование новых устойчивых штаммов протекает чрезвычайно медленно. Из более чем 5000 производных хинолона, получаемых исключительно методом химического синтеза, многие находят широкое применение в медицине, например ципрофлоксацин (Ciprobay®), действующий против *Bacillus anthracis*.

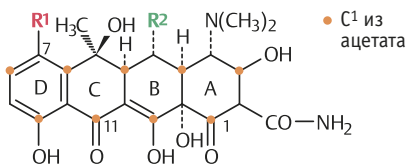
Хлорамфеникол был выделен из *Streptomyces venezuelae* еще в 1950 г., однако в современном производстве этот антибиотик получают исключительно методом химического синтеза. Предшественник хлорамфеникола хоризмовая кислота образуется как промежуточный продукт при биосинтезе ароматических аминокислот. Хлорамфеникол был первым антибиотиком с широким спектром антимикробного действия; он активен против многих грамотрицательных и грамположительных бактерий, актиномицетов, риккетсий и крупных вирусов. Однако из-за нежелательных побочных эффектов, в том числе затрагивающих костный мозг, в современной медицине хлорамфеникол используется только в качестве резервного препарата при лечении тифа и инфекционных заболеваний, вызванных шигеллами и риккетсиями. Механизм действия заключается в связывании молекул антибиотика с 50S-субъединицей 70S-рибосом, что приводит к ингибированию активности пептидилтрансферазы.

Гризеофульвин — производное бензофурана, применяется в качестве фунгицида. Действие гризеофульвина заключается в том, что он препятствует митозу в клетках грибов, в результате чего образуются морфологически измененные и функционально неполноценные гифы. Этот антибиотик получают путем ферментации и используют для лечения грибковых заболеваний кожи человека, а также для защиты растений от различных заболеваний типа мучнистой росы.

Хиноидные и ароматические антибиотики

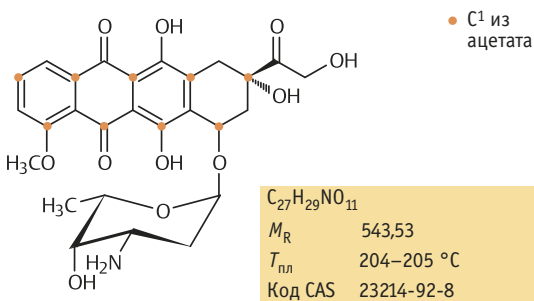
Продукт	Применение	
(Хлор-)тетрациклин Окситетрациклин	<i>Streptomyces aureofaciens</i> <i>Streptomyces rimosus</i>	Антибиотик широкого спектра действия; используется в медицине и ветеринарии
Антрациклины	<i>S. peucetius</i>	Терапия онкологических заболеваний
Хинолоны	Химический синтез	Антибиотик широкого спектра действия; используется в медицине и скотоводстве
Хлорамфеникол	Химический синтез	Антибиотик широкого спектра действия
Гризеофульвин	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Борьба с грибковыми заболеваниями растений

Тетрациклины

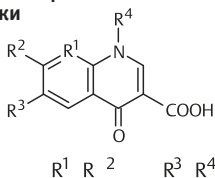


Хлортетрациклин	R ¹	R ²
C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	Тетрациклин	H
M _R 478,89	Хлортетрациклин	Cl
Код CAS 57-62-5	Окситетрациклин	H
		OH

Доксорибуцин – представитель антрациклинов

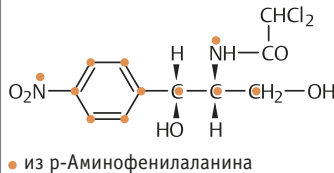


Налидиксовая кислота и ципрофлоксацин – хинолиновые антибиотики



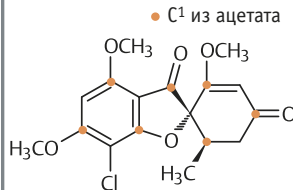
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Налидиксовая кислота	N	CH ₃	H	CH ₃
Ципрофлоксацин	CH	C ₄ H ₉ N ₂	F	C ₃ H ₅

Хлорамфеникол

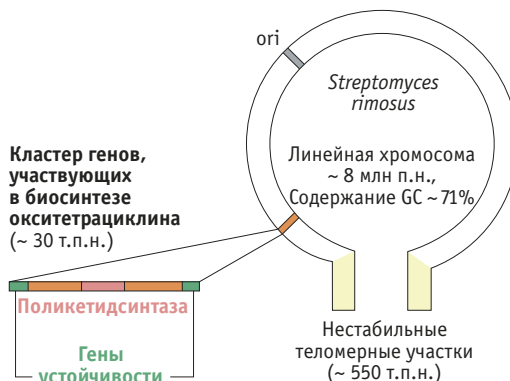
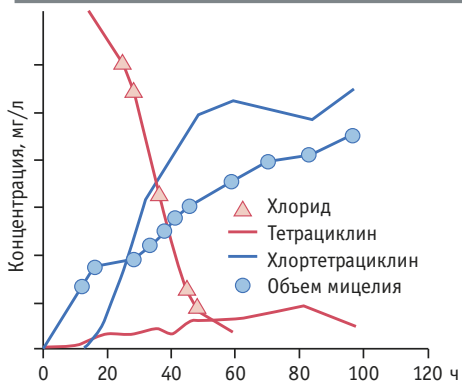


C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	Код CAS 56-75-7
M _R 323,13	

Гризеофульвин



C ₁₇ H ₁₇ ClO ₂	Код CAS 126-07-8
M _R 352,77	



Ферментация и очистка хлортетрациклина

Предферментация

Штамм-супер-продукцент *Streptomyces aureofaciens*

Биореактор

Объем до 150 м³, сахараза, жидкий кукурузный экстракт, соли, аэрация с интенсивностью 1 объем реактора/мин, 28 °C, pH 5,8–6,0; 60–65 ч

Выделение и очистка

Удаление мицелия при пропускании культуры через фильтровальный пресс или сепаратор; многостадийная экстракция *n*-бутилацетатом, очистка ионообменной хроматографией

Выход продукта ~ 10 г/л после 140 ч ферментации

Поликетидные антибиотики

ВВЕДЕНИЕ. К этой обширной группе относятся макролидные, полиеновые, макротетролидные и ансамициновые антибиотики. Общим в их структуре является наличие макроциклического лактонового или лактамного кольца, которое образуется из длинной цепи остатка полигидроксигирной кислоты с концевой гидроксильной или аминогруппой. Циклическая молекула может содержать остатки редких сахаров (макролидные антибиотики), ароматические хромофорные группы (ансамидин), участки, представляющие собой диены (полиеновые антибиотики) или иметь структуру полилактона (макротетролидные антибиотики). Большинство поликетидных антибиотиков образуются в клетках стрептомицетов как вторичные метаболиты. Препараты поликетидных антибиотиков применяются в медицине, животноводстве и пищевой промышленности. Объем рынка макролидных антибиотиков медицинского назначения в 2004 г. составил 5,7 млрд долл. США.

МАКРОЛИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ — это липофильные вещества с сильновыраженными основными свойствами. Они представляют собой 10–60-членные макроциклические лактоны. Синтез этих молекул происходит в ходе повторяющихся циклов конденсации аналогично синтезу длинноцепочечных жирных кислот: наращивание цепи происходит в реакциях, катализируемых поликетидсинтазой. Макролидные антибиотики слаботоксичны, поэтому их применяют в педиатрии. Механизм действия заключается в ингибировании синтеза белка в клетках грамположительных микроорганизмов: молекула антибиотика связывается с 50S-субъединицей бактериальной рибосомы, что препятствует процессу транслокации растущей полипептидной цепи. Устойчивость некоторых штаммов к действию макролидных антибиотиков связана с метилированием 23S-pРНК: вероятно, из-за этого не происходит связывания молекулы антибиотика с рибосомой. Азитромицин, кларитромицин, эритромицин и спирамицин используют для лечения бактериальных инфекций дыхательных путей. Структурно сходный тилозин благодаря своей высокой эффективности был использован против микоплазмоза как добавка к корму свиней, что привело к его запрету в странах ЕС (но не в США) из-за высокого риска развития устойчивости патогена.

ПОЛИЕНОВЫЕ АНТИБИОТИКИ — продукты вторичного метаболизма стрептомицетов; в молекуле этих антибиотиков имеется 26–38-членное лактоновое кольцо, в которое встроена 3–7-членная молекула диена. Диены могут содержать различные боковые группы, в частности остатки аминокислот, присоединенные гликозидной связью. Действие полиеновых антибиотиков объясняется их взаимодействием с микостеролами (например, эргостеролом) — веществами, кото-

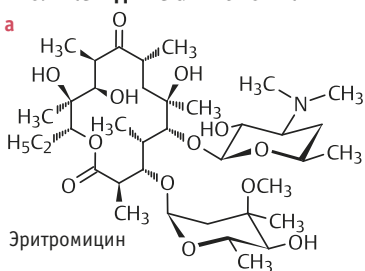
рые синтезируются только дрожжами и грибами. Таким образом, антибиотики класса полиенов не эффективны в борьбе с бактериями. Амфотерицин В и нистатин используются при грибковой инфекции *Candida albicans*, а пимаринин — в производстве сыра в качестве консерванта. Полиеновые антибиотики обладают нефро- и гепатотоксичными свойствами, поэтому их применяют только при тяжелых заболеваниях. Химическая лабильность этих антибиотиков не позволяет использовать их в качестве противогрибкового средства для защиты растений.

АНСАМИЦИН — это макролактamный антибиотик, содержащий молекулу ароматического хромофора. Важнейший заменитель ансамицина — рифамицин — синтезируется в *Amycolatopsis mediterranei*. Оба они эффективно действуют против грамположительных бактерий и микобактерий. Рифамицин — полусинтетический антибиотик, в настоящее время является важнейшим препаратом, используемым для лечения туберкулеза (возбудитель — *Mycobacterium tuberculosis*) и проказы. Механизм действия рифамицина заключается в связывании β -субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактерий. Таким образом, антибиотик препятствует процессу транскрипции в бактериальной клетке. Связывания рифамицина с эукариотическими РНК-полимеразами не происходит, поэтому антибиотик успешно используется для лечения человека. Устойчивость некоторых штаммов к действию рифамицина вызвана изменениями структуры РНК-полимеразы в результате мутаций.

ФЕРМЕНТАЦИЯ И ОЧИСТКА. Для промышленного производства поликетидных антибиотиков осуществляют ферментацию в биореакторах большого объема с использованием штаммов-суперпродуцентов. Так, для получения эритромицина применяют штамм *Saccharopolyspora erythraea* (прежнее название — *Streptomyces erythraeus*), позволяющий получать до 7 г продукта с литра среды после 72 ч ферментации. Антибиотики выделяются во внеклеточную среду, откуда их экстрагируют с помощью растворителей, а затем очищают хроматографическими методами.

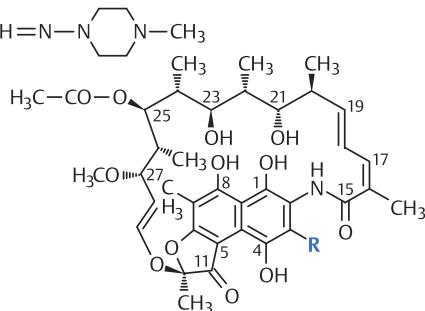
Поликетидные антибиотики

а

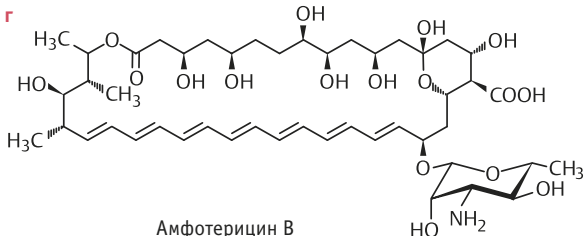


б Рифампицин R = CH=N-N(CH₂)₆-CH₃

в Рифамицин R = H



г



а C₃₇H₆₇NO₁₃
M_R 733,94
Код CAS 114-07-8

б C₄₃H₅₈N₄O₁₂
M_R 822,95
Код CAS 13292-46-1

в C₃₇H₄₇NO₁₂
M_R 697,78
Код CAS 6998-60-3

г C₄₇H₇₃NO₁₇
M_R 924,09,
Код CAS 1397-89-31

Биосинтез эритромицина А

1 × пропионовая кислота

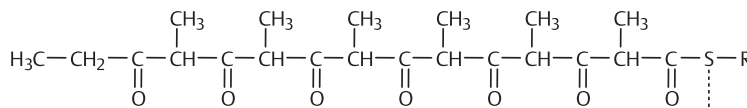
6 × сукцинил-КоА

1 × пропионил-КоА

6 × 2-метилмалонил-КоА

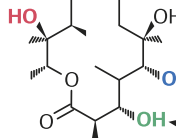
2 × D-глюкоза

2 × дТТФ*



Гидроксилирование

НО



Гликозилирование

дТДФ-D-дезозамин

дТДФ-L-микароза

Эритромицин С

Метилирование микарозы

Эритромицин А

2 × дТДФ-4-оксо-β-Д-глюкоза

* дТТФ – дезокситимидинтрифосфат

Получение

Эритромицин

Ферментация

Штамм-суперпродуцент *Saccharopolyspora erythraea*, непрерывная ферментация в биореакторе объемом более 120 м³, глюкоза, соевая мука, микроэлементы, 0,2–0,5% пропанол, 33 °С, 70–120 ч

Рифамицин/Рифампицин

Ферментация

Штамм-суперпродуцент *Amycolatopsis mediterranei*, непрерывная ферментация в биореакторе объемом более 120 м³, глюкоза, соевая мука, микроэлементы, 0,2–0,5% пропанол, 33 °С, 70–120 ч

Отделение клеточной массы с помощью фильтровального пресса или в сепараторах

Выделение и очистка

Экстракция в противотоке уксуснокислого эфира масляной кислоты, хроматографические методы, перекристаллизация

Выход продукта ~ 7 г/л эритромицина после 72 ч

Выход продукта ~ 7 г/л рифамицина после 72 ч

Четырехстадийный синтез рифампицина по методу Манниха

Получение новых антибиотиков

ВВЕДЕНИЕ. Несмотря на значительные успехи медицины, связанные с использованием антибиотиков, и большое число новых лекарств, обладающих антибиотическим действием, в современном мире распространяются инфекционные заболевания, уже считавшиеся полностью побежденными, например туберкулез, стрептококковые и стафилококковые инфекции. Появление новых форм возбудителей заболеваний объясняется возникновением устойчивости микроорганизмов к используемому антибиотику (антибиотикам). Гены, обеспечивающие такую устойчивость, распространяются посредством плазмид и/или транспозонов; таким образом возможна передача генетического материала как между сходными (при конъюгации), так и между различными (при фаговой инфекции) организмами. Важной проблемой при поиске новых антибиотиков, как правило, является их высокая токсичность для человека. Грибы, дрожжи и простейшие — эукариоты, и для них характерны общие для эукариот особенности обмена веществ, поэтому большинство веществ, токсичных для этих возбудителей заболеваний, оказываются токсичными и для человека. Очевидно, что актуальность задачи создания новых антибиотиков не ослабевает.

НОВЫЕ СТРАТЕГИИ СКРИНИНГА. Использование классического метода скрининга, в частности с применением биочипов, приводит к тому, что из 10 проанализированных веществ 9 имеют новую, ранее неизвестную структуру, но вовсе не обязательно новые свойства. Таким образом, очевидна необходимость разработки новых подходов к поиску веществ, обладающих антибиотическим действием. Приведем несколько примеров принципиально новых стратегий.

а) «Биосинтез, направляемый предшественником» — полусинтетический метод, при котором в среду роста микроорганизма-продуцента добавляют вещества-предшественники антибиотика.

б) Скрининг среди малоизученных микроорганизмов, например миксобактерий, редких актиномицетов, лишайников или губок.

в) Усовершенствование технологии микрочипов.

г) Поиск промежуточных продуктов биосинтеза антибиотиков.

д) Осуществление генетической рекомбинации между различными продуцентами антибиотиков.

е) Поиск предшественников антибиотиков методами «обратной генетики».

ж) Осуществление рекомбинации генов — участников биосинтеза антибиотиков в системе *in vitro*, и использование полученных ферментов в синтезе новых веществ *in vivo* (комбинаторный биосинтез).

з) Поиск новых мишеней действия антибиотиков на основе анализа генома патогенных микроорганизмов.

ОБРАТНАЯ ГЕНЕТИКА. Если в определенном организме установлена нуклеотидная последовательность гена фермента, участвующего в биосинтезе антибиотика, эта информация может послужить для поиска генов, кодирующих ту же ферментативную активность в геномной ДНК других организмов. Так была получена важная информация о взаиморасположении генов, ответственных за синтез макролидных антибиотиков.

КОМБИНАТОРНЫЙ БИОСИНТЕЗ. Примером может служить получение новых макролидных антибиотиков с измененными свойствами. Гены, кодирующие три фермента комплекса поликетидсинтазы, катализирующей наращивание углеродной цепи, организованы в виде кластера. Аналогичным образом расположены и гены ферментов, определяющих модификации поликетидной цепи. Клонирование всех этих генов позволило осуществить обмен генами между кластерами, и рекомбинантные ДНК в составе плазмид вновь были внесены в клетки организма-хозяина. Так было получено несколько новых макролидных антибиотиков, не найденных в природе и обладающих специфическими свойствами.

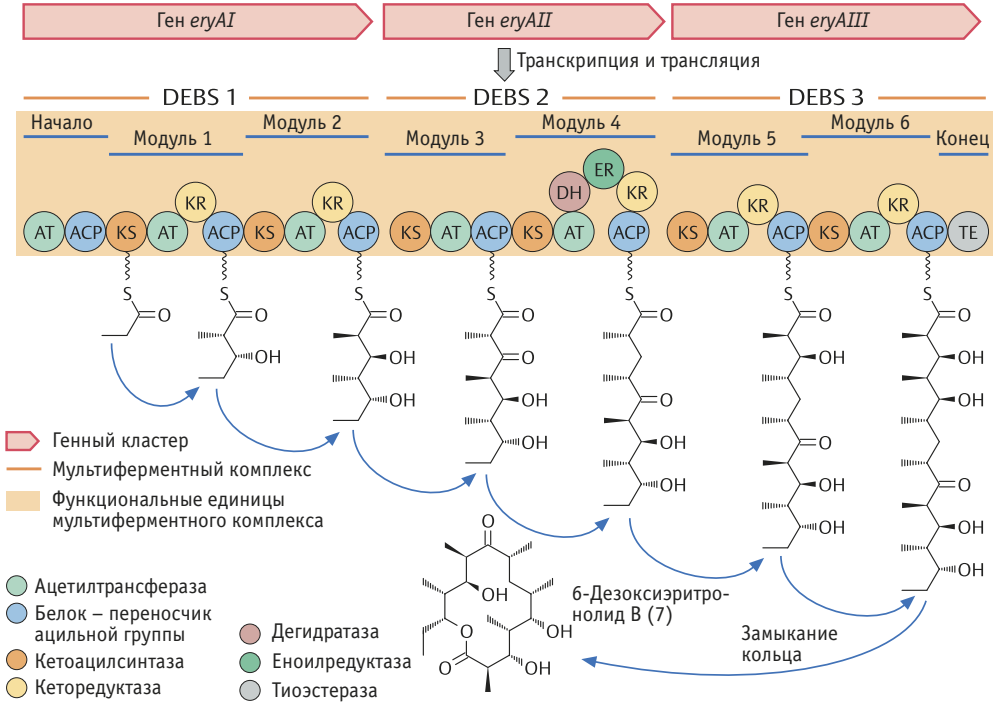
ПОИСК НОВЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДАМИ ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА. С каждым годом увеличивается число микроорганизмов, для которых нуклеотидная последовательность генома полностью известна. В качестве примера приведем несколько микроорганизмов — возбудителей заболеваний человека, геном которых в настоящее время секвенирован: *Haemophilus influenzae* (1,83 млн п.н., хронический бронхит), *Helicobacter pylori* (1,67 млн п.н., язвенные заболевания), *Borellia burgdorferi* (0,91 млн п.н., боррелиоз), *Mycobacterium tuberculosis* (4,41 млн п.н., туберкулез), *Treponema pallidum* (1,14 млн п.н., сифилис), *Chlamydia trachomatis* (1,04 млн п.н., инфекционные заболевания глаз). Анализ генома позволяет выявлять особенности метаболизма или сигнальные пути, специфические для патогенного организма. Впоследствии эта информация может служить для создания антибиотиков, действующих на новые «мишени». Так, в настоящее время проводятся работы по созданию антибиотика, действующего против *Helicobacter pylori*: по данным геномного анализа предполагаемой мишенью действия этого нового антибиотика могут быть ферменты — участники обмена никеля в микроорганизме.

Вещества-предшественники в биосинтезе антибиотиков

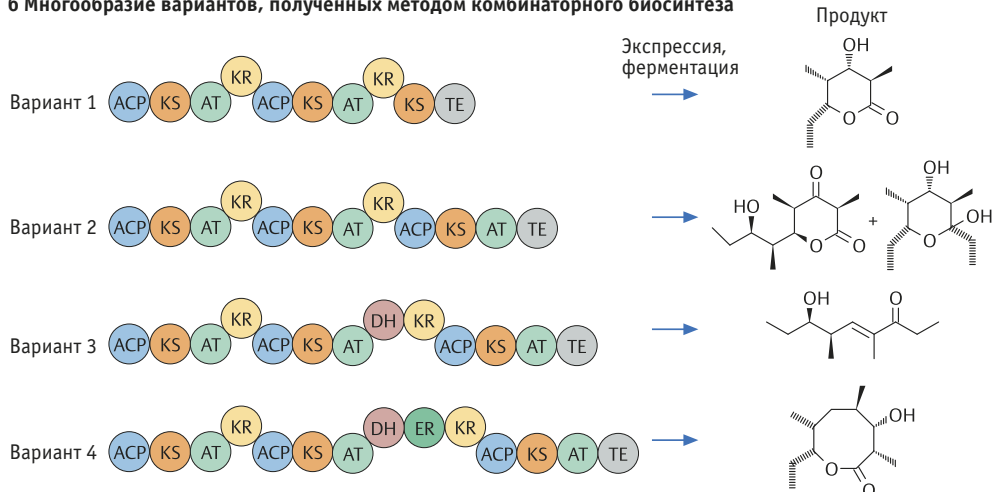
Антибиотик	Продуцент	Структурные элементы
Пенициллины	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Разнообразные алифатические, ациклические и ароматические карбоновые кислоты
Цефалоспорины	<i>Acremonium chrysogenum</i>	S-Карбоксиметил-L-цистеин
Блеомицин	<i>Streptomyces sp.</i>	Модифицированные амины
Бацитрацин	<i>Bacillus licheniformis</i>	D-алло-Аминокислоты
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i>	2-Дезоксистрепидин

Комбинаторный биосинтез макролидных антибиотиков

а Образование мультиферментного комплекса дезоксиэритронолид-В-синтазы (DEBS) 1–3



б Многообразие вариантов, полученных методом комбинаторного биосинтеза



Витамины

ВВЕДЕНИЕ. Витамины используются как лекарственные препараты, а также как пищевые и кормовые добавки. Мировой объем рынка витаминов составляет около 3 млрд долл. США в год. Большинство витаминов получают путем химического синтеза или экстракции из растительного материала. Биотехнологическим путем производятся витамины В₂, В₁₂ и С.

ВИТАМИН В₂ (РИБОФЛАВИН). Рибофлавин в форме ФМН или ФАД – важнейший кофермент в окислительно-восстановительных процессах. В свободном виде рибофлавин присутствует только в молоке. Недостаток этого витамина в пище приводит к кожным патологиям, нарушению роста и глазным болезням. У животных рибофлавин образуется в сложной многостадийной реакции из гуанозинтрифосфата. В промышленности витамин В₂ получают одним из трех способов: химическим синтезом, ферментацией или химико-ферментативным методом. В последние годы по экологическим и экономическим соображениям стали использовать ферментативные технологии. Рибофлавин производят путем ферментации штаммами-суперпродукентами *Ashbya gossypii*. В биореактор в качестве источника углерода добавляют мелассу, а в качестве источника азота – соевая мука; выход рибофлавина составляет до 15 г/л за 72 ч. После удаления клеток продукт очищают хроматографически. При химико-ферментативном методе получения витамина В₂ аллоказиноное кольцо синтезируют химическим способом, а затем также путем химической реакции соединяют его с остатком D-рибозы, которую в свою очередь получают из D-глюкозы в клетках мутантных штаммов *Bacillus pumilus*. Такой метод пока не нашел широкого применения в промышленности.

ВИТАМИН В₁₂ (ЦИАНОКОБАЛАМИН). В качестве кофермента производное витамина В₁₂ (5'-дезоксиденозилкобаламин) участвует в чрезвычайно важных реакциях метилирования и изомеризации. Этот витамин является необходимым компонентом пищи человека и большинства животных. При недостатке витамина В₁₂ в пище может развиваться так называемая злокачественная (*пернициозная*) анемия. Около половины производимого в мире витамина В₁₂ используется в качестве кормовых добавок при разведении сельскохозяйственных животных. Биосинтез из почти 30 реакций включает стадию образования 5'-дезоксиденозилкобаламина через 5-амино-4-оксвалериановую (δ-аминолевулиновую) кислоту при конденсации сукцинил-КоА и глицина. Промышленное производство витамина В₁₂ осуществляется исключительно ферментацией с использованием *Propionibacterium shermanii* или *Pseudomonas denitrificans*. В биореакторы в качестве сырья добавляют мелассу и аммонийные соли, а также веществ-

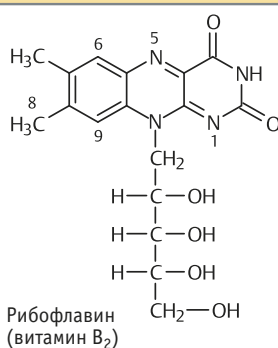
ва-предшественники – соли кобальта и 5,6-диметилбензимидазол. Через 120 ч после начала ферментации содержание витамина В₁₂ в среде может достигать 150 мг/л. К настоящему времени клонированы все гены *Propionibacterium shermanii*, продукты которых участвуют в биосинтезе витамина В₁₂, а методами метаболической инженерии ведутся работы по созданию новых штаммов-суперпродукентов.

ВИТАМИН С (L-АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА). Аскорбиновая кислота является «физиологическим восстановителем» и участвует во многих реакциях как кофактор, а также служит в качестве антиоксиданта, восстанавливающего кислородные радикалы. Дефицит витамина С приводит к возникновению цинги (скорбута) – заболевания соединительной ткани. Аскорбиновая кислота продается в аптеках, ее также добавляют в продукты питания в качестве антиоксиданта. Годовое производство витамина С достигает 95 000 т. Промышленный способ получения аскорбиновой кислоты из D-глюкозы основан на комбинации химического синтеза и ферментации. По методу *Рейхштейна–Грюсснера* реакция окисления D-сорбита в L-сорбозу осуществляется в непрерывном режиме с помощью иммобилизованных клеток *Acetobacter suboxydans* в две стадии. При этом необходима интенсивная и постоянная подача воздуха в реактор. Через 24 ч ферментации выход продукта практически количественный. По методу *Соноямы* происходит окисление D-глюкозы клетками *Erwinia sp.* до 2,5-диокси-D-глюкозы с последующим восстановлением до 2-оксо-L-гулоновой кислоты с помощью *Corynebacterium sp.*; эффективность переработки сырья на первой стадии составляет 94% через 24 ч, а на второй – 92% через 66 ч. Затем образовавшаяся 2-оксо-L-гулоновая кислота легко превращается в кислых условиях в L-аскорбиновую. Гены ферментов, которые осуществляют две указанные реакции, в настоящее время клонированы, и специалистами фирмы Genentech получен рекомбинантный штамм *Erwinia herbicola*, который осуществляет весь процесс превращения D-глюкозы в 2-оксо-L-гулоновую кислоту с последующим окислением в L-аскорбиновую кислоту. Однако рост клеток полученного рекомбинантного штамма *Erwinia herbicola* значительно замедляется в присутствии D-глюкозы, поэтому пока этот метод получения витамина С экономически невыгоден.

Витамины



$C_6H_8O_6$
 M_R 176,13
Код CAS 50-81-7

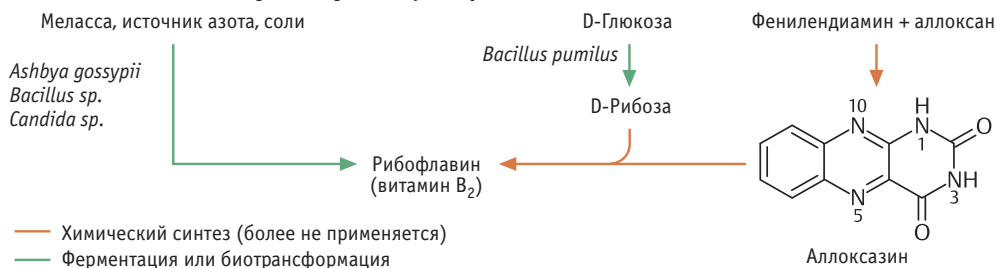


$C_{17}H_{20}N_4O_6$
 M_R 376,36
Код CAS 83-88-5

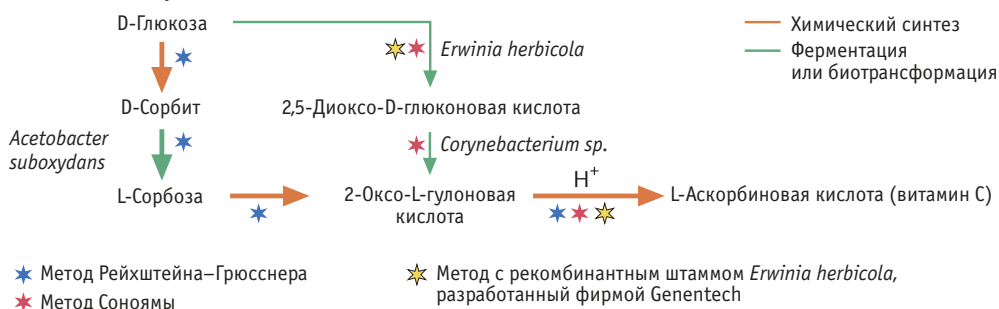
Способы промышленного получения и объемы производства

Витамин	Объем производства, т (2004 г.)	Способ получения	Применение	
А и про-А	β-Каротин	2 900	Химический синтез	Корм для животных, краситель
В ₁	Тиамин	3 300	Химический синтез	Корм для животных, здравоохранение
В ₂	Рибофлавин	4 000	Ферментация (100%)	Корм для животных, здравоохранение
В ₆	Пиридоксаль	3 400	Химический синтез	Корм для животных, здравоохранение
В ₁₂	Кобаламин	23	Ферментация	Медицина, корм для животных
С	Аскорбиновая кислота	95 000	Химико-ферментативный способ	Пищевая добавка, здравоохранение
Д ₃	Кальциферол	45 000	Химический синтез (из дегидрохолестерина)	Медицина
Е	α-Токоеферол	25 000 3 500	Химический синтез. Экстракция из растительных масел и водорослей	Корм для животных, пищевая добавка

Биотехнологические пути получения рибофлавина



Синтез L-аскорбиновой кислоты



Нуклеозиды и нуклеотиды

ВВЕДЕНИЕ. Уже более 100 лет в Японии известны вкусовые качества грибов, сушеной рыбы, некоторых водорослей и других природных продуктов, которые содержат 5'-нуклеотиды. Добавление очень небольших количеств 5'-нуклеотидов (0,0005–0,001%) и глутамата натрия в супы, соусы и другие блюда приводит к улучшению вкуса пищи и позволяет удалить неприятные привкусы, например привкус продуктов после хранения в металлической таре. Интересно, что свойством изменять вкус пищи обладают только инозин-5'-монофосфат, гуанозин-5'-монофосфат и ксантин-5'-монофосфат (ИМФ, ГМФ и КМФ соответственно), в то время как аденозин-5'-монофосфат, его 2'-, 3'-изомеры, 5'-дезоксирибонуклеотиды и нуклеозиды в этом отношении инертны. С 1960 г. производство 5'-ИМФ и 5'-ГМФ достигло промышленных масштабов и в настоящее время составляет несколько тысяч тонн в год. Предприятия-изготовители этих веществ расположены главным образом в азиатских странах.

СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА. Наиболее распространенными способами производства 5'-ИМФ и 5'-ГМФ являются ферментативный гидролиз РНК и ферментация.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ РНК. Наиболее доступным источником ДНК и РНК являются дрожжи. Так, в среде с пониженным отношением С/Н (меласса и отходы целлюлозной промышленности) содержание РНК в клетках дрожжей *Candida utilis* на ранних стадиях роста достигает 10–15% сухой массы и может быть еще выше при добавлении в среду Zn^{2+} и фосфатов. Дрожжи культивируют в аэробных условиях в эрлифтных биореакторах. После отделения клеточной массы РНК экстрагируют горячим щелочным раствором поваренной соли (5–20% NaCl, 100 °C) 8 ч. Затем РНК осаждают, добавляя HCl или этанол. Ферментативный гидролиз РНК осуществляет нуклеаза Р1, выделенная из *Penicillium citrinum* или *Streptomyces aureus* и предварительно очищенная от неспецифических 5'-нуклеозидаз и фосфатаз. 5'-ИМФ и 5'-ГМФ из гидролизата выделяют адсорбцией на активированном угле, ионообменной хроматографией и осаждением метанолом.

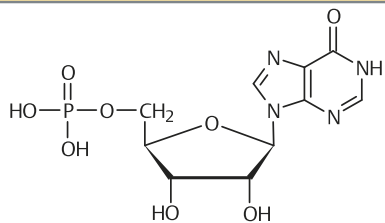
ПОЛУЧЕНИЕ 5'-ИМФ. Классическим способом получения 5'-ИМФ является выделение инозина из клеток *Bacillus sp.* и других грамположительных бактерий. Инозин, который накапливается в среде роста, может быть отделен от других компонентов осаждением при pH 11. Использование ауксотрофных по аденину мутантов, в которых методами генетической инженерии увеличена проницаемость клеточной мембраны, при оптимальных условиях ферментации позволяет получать до 35 г/л инозина. Перекристаллизованный инозин при переработке раствором PCl_3

в триалкилфосфате наконец превращается в 5'-ИМФ. Однако в настоящее время 5'-ИМФ чаще всего получают с помощью мутантных штаммов *Corynebacterium ammoniagenes*, которые выделяют этот продукт во внклеточное пространство. Штаммы-суперпродуценты обладают целым рядом особенностей, отличающих их от клеток дикого типа: в них блокирован процесс расщепления 5'-ИМФ, они нечувствительны к концентрации Mn^{2+} в среде, а, кроме того, их плазматическая мембрана является более проницаемой для 5'-ИМФ. Особенно высокие выходы продукта (до 30 г/л) были получены при использовании клеток, в геноме которых клонированы несколько копий гена PRPP-трансферазы – ключевого фермента синтеза 5'-ИМФ.

ПОЛУЧЕНИЕ 5'-ГМФ. Самым распространенным способом получения 5'-ГМФ является синтез 5-амино-4-имидазолкарбоксиамид-1-рибозид-5'-фосфата (AICAR) в клетках штаммов *Bacillus megaterium*, ауксотрофных по пуринам, с последующим химическим превращением этого вещества в 5'-ГМФ. Другой метод производства 5'-ГМФ основан на использовании мутантных штаммов *Bacillus*, в которых блокирован процесс расщепления 5'-ГМФ и искусственно повышено содержание ксантинмонофосфатов. Выходы продукта достигают 40 г/л.

ДРУГИЕ НУКЛЕОТИДЫ. АТФ, цАМФ, $NAD^+/NADH$, $NADP^+/NADPH$, FAD и кофермент А широко используются в биохимических исследованиях. Как правило, их получают ферментацией с мутантными штаммами или в ферментативных реакциях веществ-предшественников, синтезированных химическим путем. Например, NAD^+ и кофермент А образуются в результате ферментации в клетках мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes* с выходом продукта до 2 г/л.

Инозин-5'-монофосфат

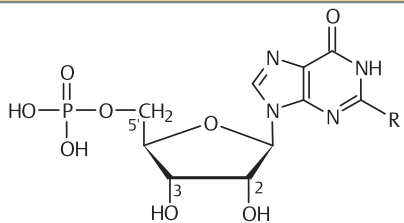


$C_{10}H_{13}N_4O_6P$

M_R 348,21

Код CAS 131-99-7

Гуанозин-5'-монофосфат



R = NH₂: гуанозин-5'-монофосфат (5'-ГМФ)

$C_{10}H_{14}N_5O_8P$ M_R 363,22

Код CAS 85-32-5

R = OH: ксантин-5'-монофосфат

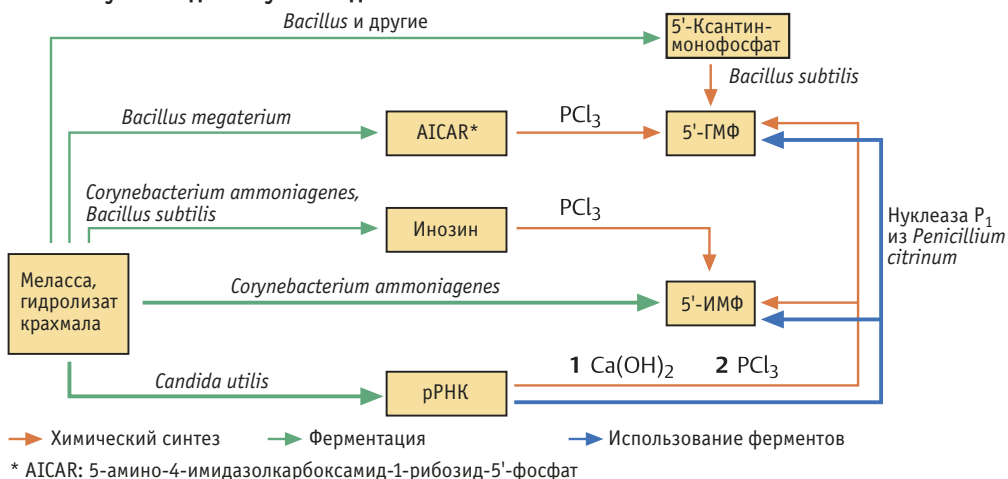
Получение и объемы производства

Нуклеозид	Объем производства, т/год	Способ получения	Применение
5'-ИМФ 5'-ГМФ	2000 1000	Ферментативный гидролиз РНК из дрожжей, ферментация инозина/гуанозина и их фосфорилирование; прямое получение 5'-ИМФ ферментацией	Усилители вкуса
Инозин	25	Ферментация	Медицина
Оротовая кислота	20	Ферментация	Терапия заболеваний печени
Аденин, аденозин, АТФ	22	Ферментация	Медицина

Содержание ДНК и РНК в различных микроорганизмах

	Бактерии	Дрожжи	Грибы	
ДНК*	0,37–4,5	0,03–0,52	0,15–3,3	* % сухой массы
РНК**	5–25	2,5–15	0,7–28	** из них 75–80% рРНК

Синтез нуклеотидов и нуклеозидов



Ферментация

Штаммы-суперпродуценты *C. ammoniagenes*; гидролизат крахмала, неочищенная РНК; рН 6, 30 °С

Выделение

Осаждение при рН 11; перекристаллизация

Более 30 г/л инозина после 42 ч ферментации

Химический синтез

Из 5'-ИМФ: PCl₃ в триалкилфосфате, выход более 90%

Биодетергенты и биокосметика

ВВЕДЕНИЕ. Некоторые микроорганизмы в присутствии алканов, в частности в растительных маслах, или на сахаросодержащем субстрате способны синтезировать поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые называются биосурфактантами или биодетергентами. В отличие от синтетических ПАВ, производство которых достигает нескольких миллионов тонн в год, весьма дорогостоящие биодетергенты пока находят ограниченное применение, несмотря на то что эти ПАВ проявляют очень высокую биологическую активность и легко разлагаются в природной среде. В настоящее время активно проводятся исследования этих веществ с целью их применения для очистки почв и воды; их можно, по-видимому, добавлять также в косметические кремы (биокосметика). Все косметические средства, которые получают (полностью или частично) из природных источников, имеют общее название «биокосметика». Методами биотехнологии получают природный краситель шиконин, а также теперь уже широко известный компонент кремов гиалуроновую кислоту.

БИОДЕТЕРГЕНТЫ (ПАВ) синтезируются многими микроорганизмами — прокариотами и эукариотами в присутствии насыщенных углеводов и в растительных маслах. Хорошо изучены сложные эфиры сахаров и жирных кислот из бактерий: рамнолипиды и трегалоллипиды, липопептид сурфактин и гетерополисахарид эмульзан. Из биодетергентов лучше всего изучен софоролипид из дрожжей. Этот гликолипид представляет собой смесь кислоты и лактона и образуется при культивировании клеток дрожжей *Torulopsis bombicola* в присутствии триглицеридов с выходом более 400 г/л. Переработку культуральной среды выгодно производить сразу по окончании ферментации. Высокоструктурированные синтетические неионные детергенты могут давать коллоидные растворы (это свойство характеризует специальным параметром — критической концентрацией мицеллообразования, ККМ). В Японии софоролипиды в небольших количествах добавляют в косметические средства по уходу за кожей. Другим перспективным направлением применения биодетергентов является их использование для очистки почв от продуктов нефтепереработки. Соединения с поверхностно-активными свойствами образуются микроорганизмами в присутствии алканов или триглицеридов: например, головневый гриб *Ustilago maydis* синтезирует целлобиолипид, некоторые представители псевдомонад — рамнолипид, а *Rhodococcus erythropolis* — тетраэфир трегалозы. В некоторых случаях состав ацильной группы в молекулах гликолипидов зависит от природы алкана или триглицерина в среде роста. Эмульзан — полианионный гетерополисахарид (липополисахарид), который синтезируют клетки *Acinetobacter calcoaceticus* в присутствии триглицеридов, его выделяют экстракцией

органическими растворителями. Эмульзан проявляет поверхностно-активные свойства на границе раздела воды и нефти и поэтому используется в качестве эмульгатора для уменьшения вязкости нефти. Добавление небольших количеств эмульзана к нефти значительно увеличивает скорость транспорта нефти по нефтепроводам, кроме того, эмульзан используют при очистке нефтедобывающего оборудования и танкеров. Клетки *Bacillus subtilis* после добавления в среду роста гидрофобных соединений-индукторов синтезируют до 110 мг/л сурфактина — ацелированного гептапептида с низкой способностью к мицеллообразованию (большое значение критической концентрации мицеллообразования, ККМ). Сурфактин не может назначаться как медицинский препарат из-за своей гематотоксичности. Ни один из биодетергентов не получен с таким высоким выходом, как для софоролипидов.

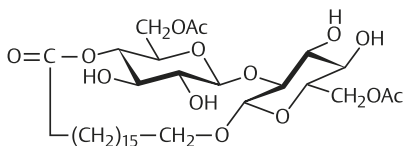
ШИКОНИН — производное нафтохинона, пигмент лепестков редкого наземного растения воробейника краснокорневого (*Lithospermum erythrorhizon*). В медицине это вещество используют как противовоспалительное средство, а также описаны случаи его успешного применения в противоопухолевой терапии. В промышленных масштабах шиконин получают из культур растительных клеток. В зависимости от того, соли какого металла добавляют в среду роста, образуется пигмент шиконин с различными оттенками. Это свойство активно используется японскими косметическими фирмами, например, при производстве губной помады.

ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА. По химической природе гиалуроновая кислота — глюкозаминогликан с молекулярной массой $\sim 10^7$ Да. Этот вязкоэластичный полисахарид входит в состав стекловидного тела глаза, суставной жидкости и связок костей. В промышленности гиалуроновую кислоту получают из пуповины сельскохозяйственных животных или из петушиных гребней. Кроме того, это вещество можно производить ферментацией с генетически модифицированными штаммами *Streptococcus equi* или *S. zooepidemicus*. Выход продукта достигает 6 г/л уже через 20 ч ферментации. Молекулы гиалуроновой кислоты образуют в воде структуру, напоминающую сетку, поэтому этот продукт иногда называют молекулярной губкой. Даже 2%-й раствор гиалуроновой кислоты в воде гелируется, так прочно взаимодействуют молекулы воды и гиалуроновой кислоты. Это свойство гиалуроновой кислоты находит применение в косметологии: раствор гиалуроновой кислоты хорошо ложится на кожу, образуя пленку, которая активно всасывает влагу из воздуха, препятствуя дегидратации кожи — основной причине возникновения морщин. В медицине гиалуроновая кислота используется прежде всего в пластической хирургии.

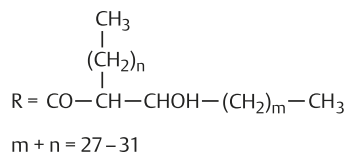
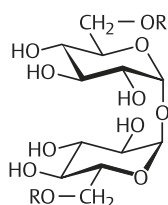
Биодетергенты

	Продуцент	Структурные компоненты
Софорозолипиды	<i>Torulopsis bombicola</i>	Софороза, жирные гидроксикислоты
Целлобиозолипид	<i>Ustilago maydis</i>	Целлобиоза, жирные кислоты
Рамнозолипид	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Рамноза, жирные кислоты
Трегалозолипид	<i>Corynebacterium, Arthrobacter</i>	Трегалоза, жирные кислоты
Кориномиколат	<i>Corynebacterium, Arthrobacter</i>	Эфир миколовой кислоты и моно-, ди- и трисахаридов
Эмульзан	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Полианионный гетерополисахарид, $M_R \sim 10^6$ Да
Сурфактин	<i>Bacillus subtilis</i>	Ацилированный гептапептид

Софорозолипид



Трегалозолипид



Инокулят

Arthrobacter sp.

Ферментация

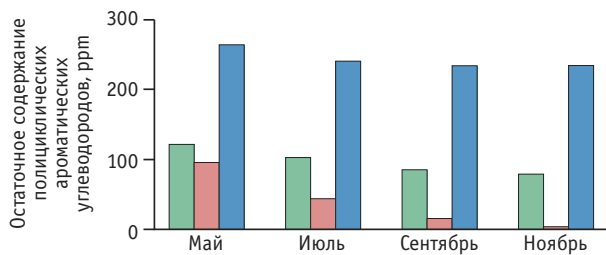
Источники углерода, азота и фосфора, морская вода; нефть для индукции синтеза

Очистка

Солюбилизация, хроматография

Выход продукта до 100 г/л

Биодетергенты и удаление нефтяных загрязнений



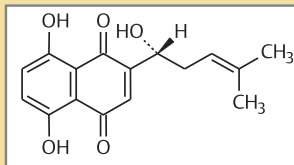
Загрязнение участка прибрежной отмели площадью 2 м² нефтью

■ 10 × загрязнение 1 литром нефти

■ 10 × загрязнение 1 литром нефти; с добавлением трегалозодикориномиколата в концентрации 1 г/л;

■ 10 × загрязнение 1 литром нефти; с добавлением неионных детергентов в концентрации 100 мл/л (диспергирует лучше, но затрудняет деградацию)

Биокосметика



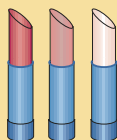
Шиконин

$C_{16}H_{16}O_5$

M_R 288,30

$T_{пл}$ 143 °C

Код CAS 517-89-5



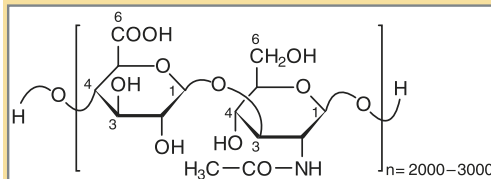
Lithospermum erythrorhizon

Иммобилизованные клетки

Реактор

Объем несколько сотен литров

Выход продукта
Несколько г/л



Гиалурионовая кислота

Streptococcus equi

Ферментация

Выход 5–10 г/л после 10 ч

Микробные полисахариды

ВВЕДЕНИЕ. Растительные полисахариды (крахмал, целлюлоза, гуммиарабик, гуаровая смола, пектин, альгинаты, агар и др.) и их полусинтетические производные играют важную роль в современных технологиях, в том числе в качестве загустителей в пищевой промышленности или при заводнении нефтяных скважин. Производство полисахаридов растительного происхождения достигает нескольких десятков тысяч тонн в год. Внеклеточные микробные полисахариды также могли бы найти применение в самых разнообразных отраслях промышленности, однако из-за значительных производственных затрат их использование пока ограничено. Наибольшее значение имеют ксантан и декстран. Гиалуриновая кислота уже применяется в биокосметике.

КСАНТАН представляет собой разветвленный гетерополисахарид, состоит из пяти остатков гексоз (глюкозы, маннозы и глюкуроновой кислоты). Молекулярная масса ксантанов — от 2 до 12 тыс. кДа. Ксантановые смолы имеют высокую вязкость (в зависимости от числа групп пирувата в полимере) и по ряду свойств сходны с пластмассой. Эти вещества безвредны для человека, поэтому их добавляют в качестве стабилизаторов и загустителей во многие пищевые продукты. Кроме того, благодаря устойчивости в растворах электролитов ксантаны добавляют к буровому шлангу при бурении нефтяных скважин. Ксантаны образуются в клетках *Xanthomonas campestris* при аэробном росте на среде с глюкозой. Получение ксантанов осуществляют, как правило, в процессе периодической ферментации, используя в качестве источника углерода глюкозу, а в качестве источника азота — пептон, нитрат аммония и мочевины. Клонирование генов β -галактозидазы (*lacZ*) и лактопермеазы (*lacY*) из *Escherichia coli* в геном *X. campestris* позволило получить штамм, использующий в качестве источника углерода молочную сыворотку (отходы молочной промышленности). Из-за образования ксантанов культуральная жидкость становится очень вязкой (до 10 000 сантипуаз). Для сохранения аэробных условий роста в этом случае особое значение имеют мешалки специальной конструкции. Как правило, ксантаны из среды осаждают растворителем — изопропанолом. В современной промышленности производство ксантанов достигает 30 000 т/год.

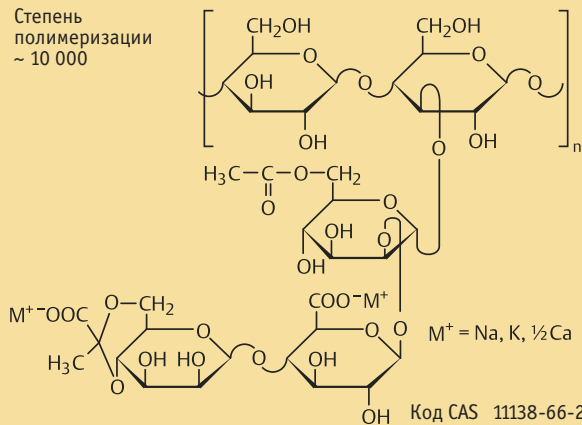
ДЕКСТРАНЫ — очень важные вещества, которые могут служить заменителями плазмы крови. Благодаря тому, что полимерные цепи в этих веществах имеют поперечные сшивки, образуются сетчатые структуры, которые очень эффективны при очистке белков разного размера. Декстраны также применяются в пищевой промышленности. Разветвленные цепи декстранов, состоящие только из остатков глюкозы, связанных между собой α -1,6-связями, имеют моле-

кулярную массу $\sim 5 \cdot 10^7$ Да. У дрожжей и некоторых бактерий декстраны играют роль резервных полисахаридов. В качестве примера продуцента декстрана можно назвать *Streptococcus mutans*, бактерию, которая обитает в кариозной полости зуба человека. Образование декстрана приводит к появлению бактериального налета («каменной»). Для промышленного получения декстрана используют *Leuconostoc mesenteroides*: в течение 24 ч в клетках этого микроорганизма из сахарозы образуется до 500 г/л декстрана. Декстран выделяют из культуральной жидкости осаждением этанолом, затем гидролизуют кислотой и еще раз осаждают этанолом. Декстран с молекулярной массой 75 000 Да используют как заменитель плазмы крови, а с молекулярной массой 40 000 Да — в качестве антитромболитика при полостных операциях.

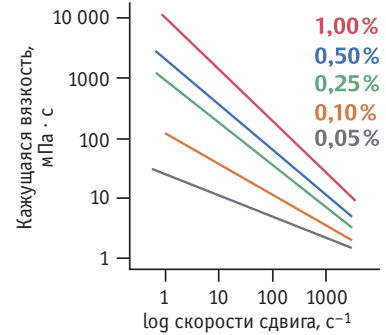
ДРУГИЕ МИКРОБНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ. *Pseudomonas aeruginosa* и *Azotobacter vinelandii* синтезируют альгинаты, по строению аналогичные альгинатам из водорослей. Альгинаты часто используют в качестве носителей для иммобилизации клеток при проведении различных биокаталитических реакций. Некоторые базидиомицеты синтезируют полимер склероглюкан, главная цепь которого образована остатками глюкозы, соединенными β -1,3-связями, а в местах разветвления остатки глюкозы присоединены β -1,6-связями. Склероглюкан, как и геллан, образующийся в клетках *Auromonas elodea*, используется как пищевая добавка. Пуллулан — глюкан с разветвленной цепью, в которой остатки глюкозы соединены α -1,4- (90%) и α -1,6- (10%) связями. Из пуллулана изготавливают тонкие пленки, не пропускающие кислород, которые используются для защиты пищевых и других продуктов от окисления. Промышленное получение микробных полисахаридов пока является очень дорогостоящим и экономически невыгодным процессом, поэтому такие полимеры еще не нашли широкого применения в современных технологиях.

Ксантан

Степень полимеризации
~ 10 000



Псевдопластические свойства



0,05–1%-я суспензия ксантана в воде, 25 °С

Ферментация и очистка

Предферментация

*Xanthomonas campestris**; глюкоза или декстран, источник азота

Биореактор

Объем более 120 м³, 40–80 ч, 28 °С, pH 7,0, специальные мешалки (из-за высокой вязкости)

Выделение

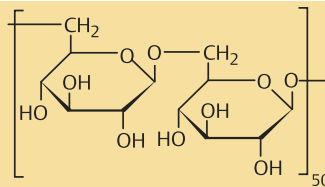
Пастеризация, осаждение этанолом или 2-пропанолом

Выход

продукта до 30 г/л после 60 ч ферментации

* *X. campestris* – растительный патоген, вторая степень биологической опасности

Декстран



Биосинтез

(1,6- α -D-глюкозил)_n + сахароза

Декстран-сахараза

(1,6- α -D-глюкозил)_{n+1} + фруктоза

Ферментация и очистка

Биореактор

Leuconostoc mesenteroides
 1) Инокуляция.
 2) Фаза синтеза; сахароза в качестве источника углерода, 23 °С

Выделение

Осаждение этанолом, ацетоном или метанолом

Гидролиз и фракционирование

Декстраны разного размера

Выход продукта 100 г/л через 24 ч (утилизируется ~ 45% сахарозы)

Производство и использование полисахаридов

Полисахарид	Объем производства, т/год	Цена, долл./кг	Микроорганизм-производитель	Применение
Ксантан	40 000	10	<i>Xanthomonas campestris</i>	Пищевая добавка, при заводнении нефтяных скважин
Декстран, производные декстрана	2000 600	35–390 400–2800	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Заменитель плазмы крови, пищевая добавка, биохимический реактив
Гиалуроновая кислота	500	2000–100 000	<i>Streptococcus equi</i>	Хирургия, косметология

Микробные полисахариды, производимые в небольших объемах: альгинат (*Azotobacter*), курдлан (*Agrobacterium, Rhizobium*), геллан (*Auromonas*), пуллулан (*Pullularia*), целлюлоза (*Acetobacter*)

Биоматериалы

ВВЕДЕНИЕ. Материалы на основе поли-3-гидроксимасляной кислоты все чаще находят применение в современной промышленности. Необычными свойствами, чрезвычайно интересными для технологического применения, обладают природные белки натурального шелка (фиброин и спидроин) или белок мидий, поэтому в настоящее время ведутся активные исследования возможностей получения этих веществ методами генетической инженерии. Производные бактериородопсина, синтезируемого *Halobacterium salinarum*, возможно, найдут применение в качестве оптического носителя информации.

ПОЛИМЕРЫ, СПОСОБНЫЕ К БИОРАЗЛОЖЕНИЮ. В промышленности уже получают из L-молочной кислоты полилактид (Nature Works™). Производится также сополимер получаемого биотехнологическим путем 1,3-пропандиола и терефталевой кислоты (Sorona™). При получении 1,3-пропандиола используются рекомбинантные штаммы *E. coli*, метаболизм которых изменен внедрением гена глицерин-дегидратазы методами *метаболической инженерии*. Многие микроорганизмы, например *Ralstonia eutropha*, в определенных условиях способны запасать в клетке полигидроксимасляную кислоту, содержание которой может достигать 90% сухой клеточной массы. Состав запасных полимеров зависит от состава питательной среды, поэтому, добавляя в среду роста различные вещества-предшественники, можно управлять процессом образования продукта. Для технологического применения наиболее интересен сополимер 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот, который проявляет свойства полипропилена, однако в отличие от последнего может разлагаться биологическим путем. Получение этого сополимера ферментацией пока очень дорогой процесс, поэтому это вещество находит лишь ограниченное применение — в медицине (препарат Biopol®). Оперон синтеза поли-3-гидроксимасляной кислоты содержит 3 гена, которые уже клонированы. Трансформация растений и клеток *Escherichia coli* плазмидами, содержащими эти гены, позволила получать поли-3-гидроксимасляную кислоту с выходом до 95% сухой клеточной массы. Для выделения образующегося в клетках полимера используют экстракцию органическими растворителями или энзиматическое расщепление.

ФИБРОИН И СПИДРОИН. Белки образуются в специальных железах гусеницы тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) для создания кокона при окукливании, а также в паутинных железах многих паукообразных (например, паука крестовика *Nephila claviceps*). Натуральное волокно имеет очень хорошие технические перспективы, в частности для создания парашютной ткани, так как многие их свойства уникальны. Волокна каркасной нити паутины, состоящие из белка спидроина, при равной толщине волокна в несколько раз прочнее стали и при этом способны растягиваться на 30% своей длины без разрыва (BioSteel™). Фиброин и спидроин являются фибрилля-

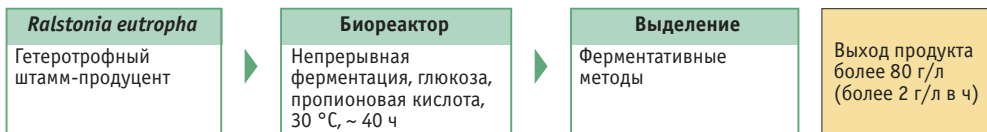
ными белками, гены которых удалось клонировать и модифицировать для экспрессии в клетках *E. coli* и *Pichia pastoris*. Выход рекомбинантных белков фиброина и спидроина составляет около 1 г/л.

БЕЛКИ С АДГЕЗИОННЫМИ СВОЙСТВАМИ. Мидии *Mytilus edulis* обладают способностью прикрепляться к раковинам ракообразных или поверхности обшивки кораблей и таким образом перемещаться на большие расстояния. Эти моллюски синтезируют специфический белок, проявляющий адгезионные свойства. Белок-предшественник имеет молекулярную массу 130 кДа и состоит преимущественно из полярных аминокислот — тирозина, серина, треонина, лизина и пролина. В ходе посттрансляционных модификаций остатки тирозина и пролина преобразуются в *o*-гидрокситирозин или 3- или 4-гидроксиг-л-пролин соответственно. На воздухе полипептидные цепи полимеризуются, и образуются дихиноны. Методами генетической инженерии удалось осуществить гетерологичную экспрессию фрагмента белка адгезии размером 25 кДа в клетках *E. coli* с достаточно высоким выходом. Однако в этих клетках-хозяевах не происходит посттрансляционных модификаций белков, поэтому выделенный рекомбинантный продукт обрабатывают ферментом тирозиназой, который гидролизует остатки тирозина до *o*-гидрокситирозина, что обеспечивает образование поперечных швов между полипептидными цепями. Полученный белок используют в медицинских целях, в том числе в стоматологии для заполнения полостей в зубе.

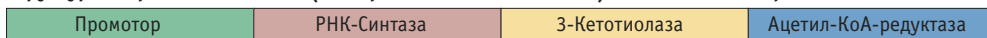
БАКТЕРИОРОДОПСИН. Галобактерия *Halobacterium salinarum* обитает в средах с повышенным содержанием поваренной соли: концентрация NaCl 3–5 М является нормальной для ее роста. При фототрофном росте бактериородопсин служит в качестве протонного насоса и таким образом снабжает клетку энергией. Молекулы бактериородопсина формируют в клеточной мембране агрегаты (бляшки), которые легко выделяются в составе так называемой «пурпурной мембраны», на 75% по массе состоящей из белков и на 25% из липидов. Препараты «пурпурных мембран» очень стабильны. Кофактор бактериородопсина ретиналь и процесс его *цис-транс*-изомеризации связан с необычной функцией: бактериородопсин действует как светозависимый протонный насос, число оборотов которого может достигать 100 в секунду. В восстановленной форме бактериородопсин имеет пурпурный цвет ($\lambda_{\max} = 570$ нм), а при протонировании ретиналя и остатка лизина в положении 216 становится желтым ($\lambda_{\max} = 410$ нм). Замена определенных аминокислотных остатков путем направленного мутагенеза дает возможность регулировать скорость циклического светозависимого изменения цвета бактериородопсина. Чрезвычайно перспективным представляется использование бактериородопсина и его производных в качестве оптического носителя информации (фотоэлемента).

Ферментация и очистка

Организм	Продукт	Фирма-производитель
<i>Ralstonia eutropha</i>	Сополимер 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот	Metabolix (коммерческий продукт)
<i>Escherichia coli</i>	Поли(3-гидроксимасляная кислота), клонирован оперон из <i>Alcaligenes latus</i>	ATO-DLO
<i>Lactobacillus</i>	Хирально чистый L-полилактид из L-молочной кислоты	Cargill (производство)
<i>E. coli</i> с генами <i>Klebsiella</i>	Сополимер пропан-1,3-диола и терефталевой кислоты	DuPont, Geneva (производство)



Структура оперона синтеза поли(3-гидроксимасляной кислоты) из *Ralstonia eutropha*



Волокна каркасной нити паутины паука-крестовика (*Nephila claviceps*)



Основной компонент белка каркасной нити
 $(\text{gly-pro-gly-gly-x})_{3-63} - (\text{gly-gly-x})_{12}$ -спейсер

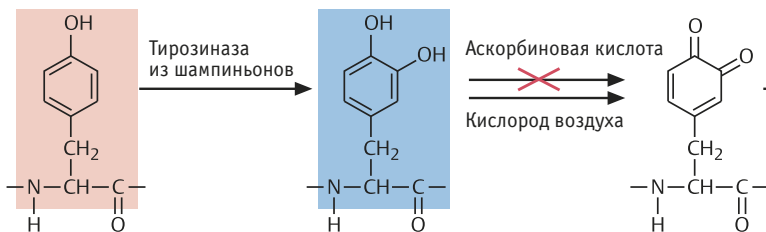
Прочность $4 \cdot 10^9 \text{ Н/м}^2$
 Эластичность 35%
 Прочность на разрыв 10^5 Дж/кг



Белок с адгезионными свойствами из мидий *Mytilus edulis*

-[ala-lys-(pro или hyp)-ser-(tyr или DOPA)-hyp-hyp-thr-DOPA-lys-]

hyp = 4-гидроксипролин
 DOPA = 3,4-дигидрокси-фенилаланин

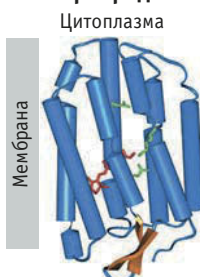


Генно-инженерный белок-предшественник

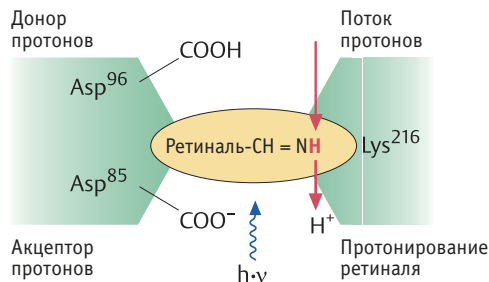
Активирован в виде преполимера, стабилизирован аскорбиновой кислотой

Окисление, образование швов и связывание с поверхностью

Бактериородопсин как протонный насос



Бактериородопсин (по рентгено-структурным данным с разрешением 0,23 нм); красным обозначен ретиналь, зеленым – Asp⁸⁵, Asp⁹⁶, Lys²¹⁶



Биотрансформация

ВВЕДЕНИЕ. Биотрансформация — основная функция организма, необходимая для осуществления нормального обмена веществ и обезвреживания токсичных веществ, в том числе ксенобиотиков. В биотехнологии под термином биотрансформация принято понимать биокатализ, то есть процесс ферментативного превращения природного или синтетического вещества-предшественника в продукт с необходимыми свойствами. Этот процесс может осуществляться в биореакторах микроорганизмами, целыми клетками животных или растений, их отдельными органеллами, а также иммобилизованными на носителях ферментами или клетками. В последние годы сильно выросла роль генетической инженерии для усовершенствования ферментов и получения рекомбинантных организмов. Термины «биокатализ», «ферментация» и «биотрансформация» в определенном смысле можно считать синонимами. Процесс биотрансформации включает одну или несколько стадий — каждую стадию катализирует отдельный фермент. Применение выделенных ферментов имеет ряд преимуществ: можно оптимизировать температурный режим проведения реакции, так как белок менее чувствителен к условиям среды, чем более сложные биологические системы (органеллы или клетки); отсутствует необходимость поддерживать стерильные условия реакции; фермент взаимодействует с субстратом более эффективно. Использование органелл или целых клеток более целесообразно в тех случаях, когда выделение фермента является сложной процедурой, если очищенный фермент нестабилен или процесс трансформации включает несколько стадий и все необходимые ферменты находятся в клетке.

МИКРООРГАНИЗМЫ используются как для получения природных метаболитов (например, глю-таминной кислоты), так и для превращения веществ, которые не являются их природными субстратами (к примеру, гидроксирование стероидов по 11β -положению). Как правило, ферменты катализируют реакции нормального метаболизма с высокой субстратной специфичностью. Экспрессия генов или целых генных кластеров, клонированных из другого организма, позволяет расширить круг веществ, подвергающихся биотрансформации, как, к примеру, в случае получения индиго. *Метаболическая инженерия* и белковый дизайн позволяют находить новые метаболические пути на основе анализа генома и играют важную роль при разработке методов промышленной биотрансформации.

ЖИВОТНЫЕ КЛЕТКИ широко используются для синтеза фармацевтических препаратов и антител в биореакторах. В настоящее время проводятся работы по созданию искусственной печени для очищения крови от некоторых токсических веществ. Токсины, выделен-

ные из крови при диализе, в результате биотрансформации осаждаются на молекулах альбумина.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ. Наиболее известный пример использования растительных клеток для биотрансформации — реакции специфического гидроксирования. Так, в культуре *Digitalis lanata* в результате гидроксирования дигитоксина по положению 12 образуется дигоксин. Биореакторы для культивирования растительных клеток по техническим причинам пригодны лишь для ограниченного числа процессов, например для синтеза таксола (PaclitaxelTM) *Taxus brevifolia*.

ОТДЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ целесообразно применять, если реакция биотрансформации проходит всего в одну стадию и может протекать в системе *in vitro*. В большинстве случаев в промышленности используются не требующие кофакторов ферменты, например, для реакций субстрат-специфичного гидролиза или этерификации. В последнее время изолированные ферменты также стали применяться для осуществления реакций присоединения по двойной связи, например в карбонильных группах.

«РЕКОМБИНАНТНЫЕ» ПУТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ. Наиболее яркими примерами использования этого подхода в промышленности является производство аскорбиновой кислоты в *Erwinia herbicola* (см. ранее) и получение индиго в рекомбинантных клетках *Escherichia coli*. Методами генетической инженерии в клетках *E. coli* была дополнительно усилена активность триптофаназы, катализирующей реакцию превращения триптофана в индол, а затем с помощью TOL-плазмиды в клетки был введен ген нафталиндиоксигеназы из *Pseudomonas sp.* Полученный рекомбинантный штамм обладает способностью синтезировать индиго — один из самых распространенных красителей для тканей. Для получения L- или D-аминокислоты из синтетических гидантоинов используют хозяйские клетки *E. coli* с векторными каскадами, содержащими рекомбинантные гидантоиназы и карбамиллазы («синтетическая биология»).

Биотрансформация

Биотрансформация/биокатализ

Синтез необходимых продуктов

Ферментация

Живые клетки
в биореакторах

«Покоящиеся» или иммобилизованные клетки

Клетки в виде суспензии
или иммобилизованные на носителе

Ферментативный катализ

Один или несколько
изолированных ферментов

Примеры реакции биотрансформации

Реакция	Организм/Фермент	Процесс	Фирма-разработчик
D-сорбит → L-сорбоза	<i>Acetobacter suboxydans</i>	Ф	Roche
Фенил-D-лактат → 4-гидроксифенил-D-лактат	<i>Beauveria gossypii</i>	Ф	BASF
Фумаровая кислота → L-аспарагиновая кислота	<i>Escherichia coli</i>	ИмК	Tanabe, DSM
D-глюкоза → D-фруктоза	Глюкозоизомераза из <i>Streptomyces</i> sp.	ИмК, ИмФ	Novo, Clinton
D,L-ацетоксиметоксифенилэтиламин → L-фенилэтиламин	Липаза из <i>Pseudomonas cepacia</i>	ИмФ	BASF
Триптофан → индиго	Рекомбинантный штамм <i>E. coli</i>	ИмПК	Genencor

Ф – ферментация;

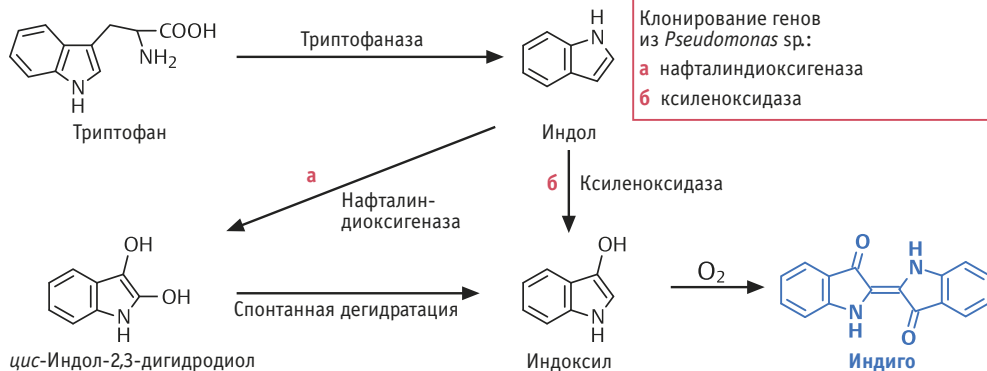
ИмК – иммобилизованные клетки;

ИмФ – иммобилизованные ферменты;

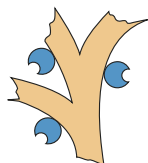
ИмПК – иммобилизованные рекомбинантные клетки

Производство индиго в рекомбинантных штаммах *E. coli*

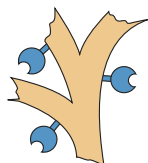
Мутантный штамм *E. coli* – суперпродуцент индола



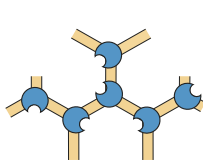
Некоторые способы иммобилизации клеток и ферментов



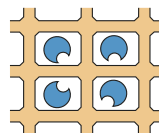
Адсорбция на носителе



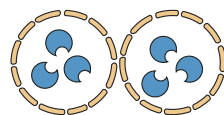
Ковалентное связывание с носителем



Образование поперечных сшивок



Включения в нерастворимый гель



Микрокапсулирование

Биотрансформация стероидов

ВВЕДЕНИЕ. Одним из примеров экономически выгодной биотрансформации является получение стероидов из стеролов.

СТЕРОИДЫ. К группе стероидов относятся более 10 000 природных и синтетических соединений, многие из которых имеют важное фармацевтическое значение. В качестве примеров можно привести витамин D₂ (кальциферол), кортикостероиды (противовоспалительные средства), эстрогены и гестагены (женские половые гормоны), спиронолактон (мочегонное средство). В промышленном синтезе стероидов используются различные типы биотрансформации: например, отщепление боковой цепи β-ситостерола с образованием андроста-4-ен-3,17-диона (АД) или андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) и гидроксילирование 11-β-атома кортексолона (также называемого соединением Рейхштейна «S»). Аналогично получению индиго в клетках *E. coli*, возможно осуществить процесс синтеза прегненолона из сахаров в клетках дрожжей, и хотя эти методы пока не используются в промышленности, очевидно, что в будущем биотрансформация станет очень важным технологическим приемом.

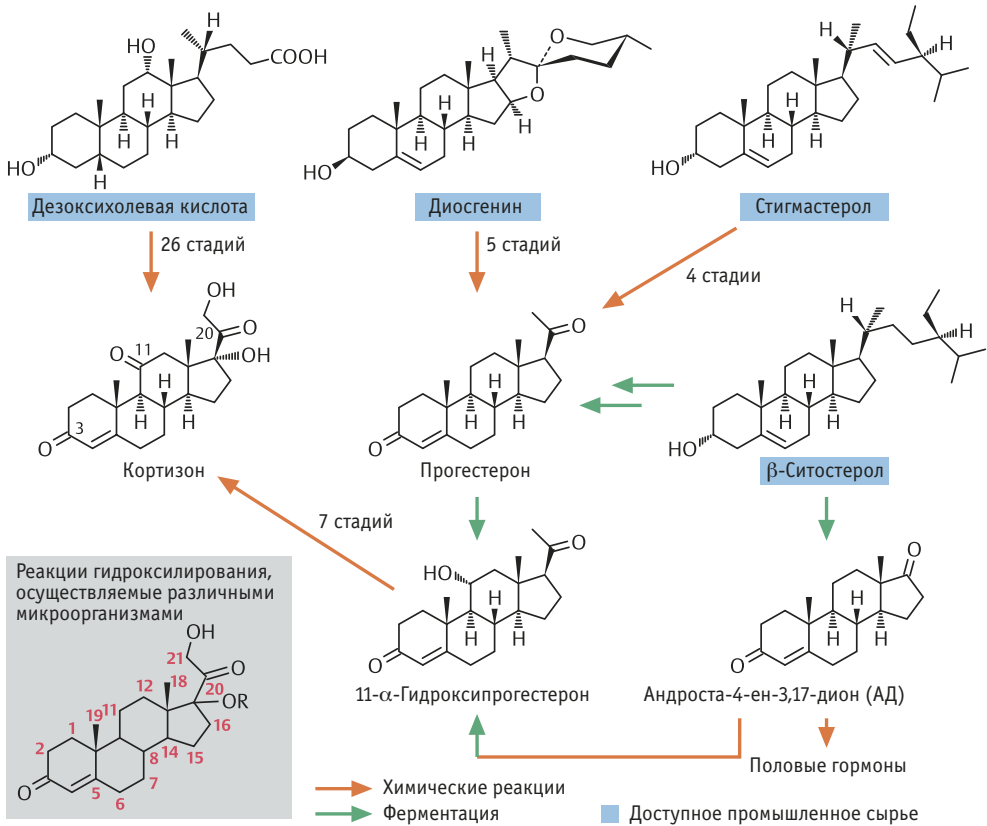
ОТЩЕПЛЕНИЕ БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ. Традиционно основным сырьем для производства стероидов служит диосгенин – природный стерол растительного происхождения, главный поставщик – Мексика. Другие источники – желчные кислоты, которые поставляют мясоперерабатывающая промышленность, и стигмастерол – побочный продукт производства витамина E из соевого масла. Процессы превращения этих веществ в важные фармацевтические продукты (кортикостероиды, половые гормоны или спиронолактон) состоят из множества стадий. Поэтому для отщепления боковых цепей, в частности от β-ситостерола из соевого или рапсового масла, представляется перспективным использование таких микроорганизмов, как *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter* или *Corynebacterium*. В результате ферментативной реакции образуется андроста-4-ен-3,17-дион и андроста-1,4-диен-3,17-дион – предшественники эстрогенов и гестагенов, а также кортикостероидных гормонов. Другие источники сырья для производства стероидов, такие как холестерол или желчные кислоты, также могут быть использованы для биотрансформации, однако пока эти методы экономически невыгодны.

ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 11β-АТОМА. Гидроксילирование – одна из важнейших стадий синтеза стероидов с заданной структурой. В настоящее время получены обширные коллекции микроорганизмов, в каждом из которых гидроксילирование протекает по определенному положению, что позволяет осуществлять гидроксילирование предшественников стероидов по всем возможным положениям. Важным примером про-

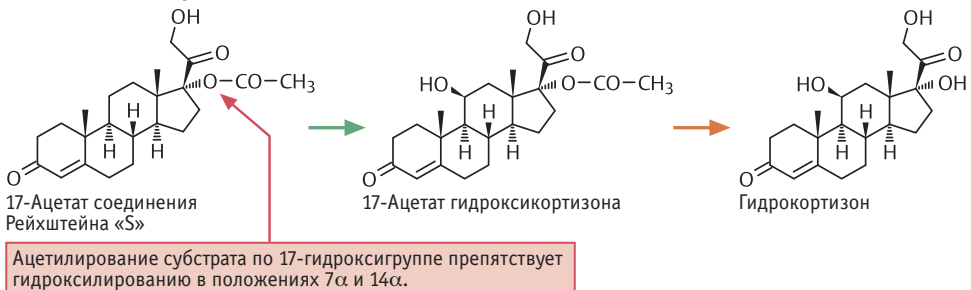
мышленного использования такой реакции является гидроксילирование одного из промежуточных продуктов синтеза гидрокортизона – соединения Рейхштейна «S» (вещество названо по имени Тадеуша Рейхштейна – швейцарского химика, лауреата Нобелевской премии 1950 г., который впервые выделил кортизон и установил его структуру). Реакция протекает в клетках плесневого гриба *Curvularia lunata*. Чтобы предотвратить гидроксילирование по 7α- и 14α-атомам, «S»-вещество предварительно ацетилируют по 17-гидроксигруппе. В процессе ферментации реакция биотрансформации идет с высокой стереоспецифичностью.

БИОСИНТЕЗ ПРЕГНЕНОЛОНА ИЗ САХАРОВ. При создании рекомбинантного дрожжевого штамма, синтезирующего прегненолон из сахаров, был использован новый экспериментальный подход. В процессе образования микостерола в дрожжах синтезируется эргостерол. В рекомбинантных штаммах были произведены следующие перестройки генома: во-первых, выключен ген фермента, ответственного за окислительное отщепление боковой цепи в Δ-22-ненасыщенных продуктах; во-вторых, в геном встроены три гена ферментов, участвующих в синтезе стеролов крупного рогатого скота, и ген *Arabidopsis thaliana* (резуховидка, двудольное травянистое растение), кодирующий Δ-7-редуктазу. Полученные рекомбинантные штаммы, в которых экспрессируются все эти ферменты, обладают способностью синтезировать прегненолон при росте на D-глюкозе. Кроме того, если в клетках осуществлять коэкспрессию 3β-гидроксистероид-дегидрогеназы человека, из прегненолона образуется прогестерон. Клонирование гена монооксигеназы P450, которая осуществляет избирательное гидроксילирование, приводит к гидроксилированию молекулы прогестерона по положениям 11β-, 17α- и 21. Таким образом рекомбинантный штамм дрожжей синтезирует гидрокортизон из сахаров. Научные достижения, основанные на фундаментальных исследованиях в области молекулярной биологии, используются в разработках компании Sanofi-Aventis при оптимизации штаммов дрожжей методами *метаболической инженерии*. Это приводит к появлению конкурентоспособной технологии.

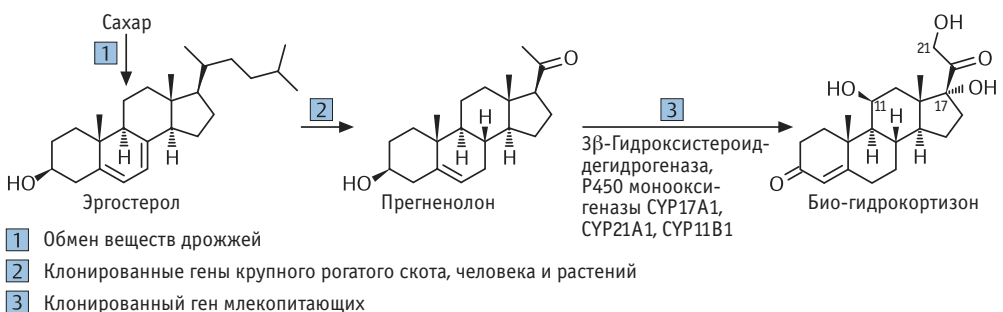
Биосинтез стероидов



Гидроксилирование соединения Рейхштейна «S» в положении 11β в клетках *Culvularia lunata*



Синтез стероидов в рекомбинантных штаммах дрожжей



Ферменты

ВВЕДЕНИЕ. Применение ферментов животного, растительного и микробного происхождения в промышленном производстве или в аналитических целях началось около 100 лет назад. В 1970 г. иммобилизованные ферменты были впервые использованы как биокатализаторы для химического превращения вещества (ферментативная трансформация). Развитие методов генетической инженерии и возможность получения рекомбинантных белков с измененными свойствами открывает новые перспективы ферментации.

КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ. В соответствии с международной классификацией ферменты разделены на 6 классов, согласно типам реакций, которые они катализируют. К настоящему времени описаны тысячи разнообразных ферментов с различными функциями. Как правило, ферменты с аналогичными функциями, выделенные из разных организмов, несколько отличаются по структуре. При оценке возможностей использования фермента в биотехнологии необходимо располагать данными о его биологических свойствах. Так, около трети всех описанных ферментов являются мембраносвязанными, они нестабильны в очищенном виде. Для осуществления ферментативной реакции многим оксидоредуктазам, трансферазам, лигазам и синтазам необходимы кофакторы, например NADH, АТФ или кофермент А, поэтому использование таких ферментов в биотехнологических целях не всегда экономически выгодно из-за высоких цен на кофакторы. Гидролазам и изомеразам кофакторы не требуются, поэтому эти ферменты широко используются в промышленности. Для большинства аналитических и диагностических исследований особенно важна высокая специфичность ферментов по отношению к субстрату.

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ. Способ выделения и очистки фермента зависит от источника (животные, растительные или микробные клетки), конкретной задачи, необходимого количества, а также биологических свойств фермента (растворимый или мембраносвязанный белок). Ферменты, секретируемые во внеклеточное пространство, удается получать в больших количествах (например, протеазы для производства стиральных порошков). В этом случае процедура очистки фермента значительно упрощена: после отделения клеток следует стадия концентрирования культуральной жидкости методом ультрацентрифугирования или осаждения. Затем – высушивание распылением или в псевдооживленном слое, после чего препарат фермента готов к промышленному использованию. Полученные таким способом препараты часто содержат значительные примеси посторонних белков, поэтому при их применении могут иметь место побочные ферментативные реакции. В промышленности

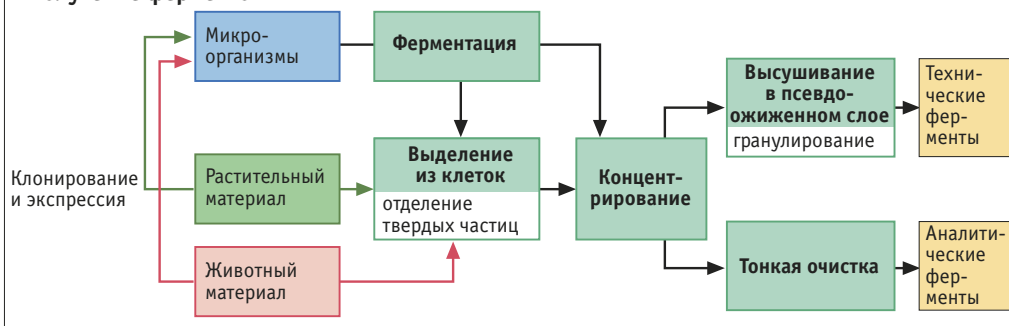
эти посторонние активности часто не влияют на производственный процесс. Для диагностических, аналитических и терапевтических целей чаще используют внутриклеточные ферменты, и в этом случае необходимы препараты ферментов с высокой степенью очистки. После разрушения клеток клеточный дебрис удаляют центрифугированием, а внутриклеточное содержимое концентрируют. Затем для удаления посторонних белков последовательно проводят несколько стадий хроматографического разделения компонентов полученного раствора. Степень очистки фермента определяют по следующим критериям: 1) удельная активность фермента; 2) активность других компонентов препарата; 3) электрофоретическая картина разделения компонентов препарата. Многие ферменты, используемые в промышленности, получены путем ферментации в рекомбинантных штаммах микроорганизмов. Методы генетической инженерии позволяют получать продукт с меньшим числом побочных активностей, следовательно, его очистка требует значительно меньших затрат.

РАЗРЕШЕНИЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИЕ. Ферменты являются природными белками, поэтому их использование во всех областях, за исключением пищевой промышленности или медицины, не требует специальных разрешений. Компоненты пищевых продуктов, полученные из природного сырья с помощью ферментов (например, изоглюкоза), относятся к «природным» и применяются наравне с естественными. В соответствии с постановлениями Международной ассоциации производителей ферментов для пищевой промышленности (AMFEP), при производстве продуктов питания разрешено использование ферментов животного и растительного происхождения, а также продуктов так называемых «безопасных» микробных штаммов. Применение ферментов, выделенных из других микроорганизмов, разрешается лишь после прохождения многочисленных и весьма дорогостоящих процедур тестирования и утверждения, поэтому использование таких ферментов в промышленных масштабах оказывается экономически невыгодным.

Классификация ферментов и примеры

ЕС-номер	Название, функция	Кофактор	Примеры
1.x.y.z	Оксидоредуктазы		
1.1.y.z	Действуют на СН–ОН-группу	NAD ⁺ , NADP ⁺ , PQQ	Алкогольдегидрогеназа
1.1.3.z	Действуют на СН–ОН-группу	FAD ⁺	Глюкозооксидаза
1.3.y.z	Действуют на С–Н-группу	Гем, Fe ²⁺	Стероид-11β-гидроксилаза
2.x.y.z	Трансферазы		
2.4.y.z	Переносят гликозильные группы		Гликозилтрансфераза
2.6.1.z	Переносят NH ₂ -группы на С=O	Пиридоксальфосфат	Трансаминаза
3.x.y.z	Гидролазы		
3.1.y.z	Гидролизуют эфирные связи		Липазы, эстеразы
3.2.y.z	Гидролизуют гликозидные связи		α-Амилаза
3.4.y.z	Гидролизуют пептидные связи		Субтилизин, трипсин
4.x.y.z	Лиазы		
	Катализируют реакции присоединения по двойным связям		
4.x.y.z	Добавление (удаление) NH ₂ -группы к (от) двойной связи		Аспартаза
5.x.y.z	Изомеразы		
5.1.y.z	Рацемизация D- и L-аминокислот		Аланинрацемаза
5.3.y.z	Внутримолекулярные оксидоредуктазы		Ксилозо(глюкозо)-изомераза
6.x.y.z	Лигазы		
6.2.y.z	Образование С–S связей	АТФ, КоА-SH	Ацетил-КоА-синтетаза

Получение ферментов



Применение

Источник	Примеры	Применение
Животные ткани	Панкреатические ферменты, сычужный фермент, пепсин	в соответствии с GMP*
Растительные ткани	Папаин, бромелаин	в соответствии с GMP*
Микроорганизмы:		
а) традиционно используемые для получения продуктов питания	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus niger</i> и <i>A. oryzae</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> и <i>K. lactis</i> , <i>Leuconostoc oenus</i>	GRAS (generally recognized as safe) – признаны безопасными в соответствии с положениями AMFEP (Международная ассоциация производителей ферментов для пищевой промышленности)
б) ферменты хорошо изученных микроорганизмов	<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. megaterium</i> и <i>B. circulans</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i>	Специальная процедура согласования

* GMP (good manufacturing practice) – «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств», принятые Всемирной организацией здравоохранения. — Прим. перев.

Ферментативный катализ

ВВЕДЕНИЕ. Преимущества использования ферментов в реакциях химического синтеза связаны с их высокой субстратной специфичностью. В промышленности, как правило, применяют ферменты, которые не требуют дополнительных кофакторов: гидролазы, лиазы, изомеразы и некоторые оксидоредуктазы. К настоящему времени гены многих ферментов клонированы, поэтому появилась возможность получать эти ферменты без побочных активностей и с некоторыми улучшенными в результате генно-инженерных манипуляций свойствами.

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ. На сегодняшний день охарактеризовано около 850 оксидоредуктаз. Эти ферменты катализируют окислительно-восстановительные реакции в присутствии кофермента. В случае оксидаз коферментом является молекула ФАД, ковалентно связанная с ферментом. Оксидоредуктазы широко применяются в аналитических методах. Дегидрогеназы используются для аналитических, а также препаративных целей в качестве восстановителей карбоксильных или окислителей гидроксильных групп. Процедура очистки кофакторов, например NAD(P)^+ или NAD(P)H , требует значительных затрат, поэтому использование этих веществ в очищенном виде является экономически невыгодным. Часто в технологический процесс включают дополнительную реакцию с недорогими субстратами, в результате которой образуются необходимые кофакторы. Значительными преимуществами обладает мембранный ферментативный реактор, в котором для синтеза кофактора используется производное NAD(P)H и формиатдегидрогеназа. В последнее время ведутся активные исследования возможностей применения пероксидаз, диоксигеназ и P450 -монооксигеназ, катализирующих определенные реакции гидроксирования. Эти ферменты содержат железо-серный кластер или гемовую группу, играющие роль кофактора.

ТРАНСФЕРАЗЫ. К настоящему времени известно около 950 ферментов, относящихся к классу трансфераз. В промышленности эти ферменты не находят применения.

ГИДРОЛАЗЫ. К классу гидролаз относится более 1000 ферментов, в том числе протеазы, липазы и эстеразы, имеющие большое значение в современной биотехнологии. По сути эти ферменты можно рассматривать как трансферазы, переносящие ту или иную группу на молекулу воды. Гидролазы катализируют гидролиз связей C-O , C-N , C-C и др. и могут применяться для синтеза или гидролиза сложных эфиров и амидов. Так, термолизин, выделенный из *Bacillus stearothermophilus*, используют для синтеза аспартама из L-аспарагиновой кислоты и L-фенилаланина, пенициллинамидазу из клеток *E. coli* — для гидролиза пенициллина G до 6-аминопеницилано-

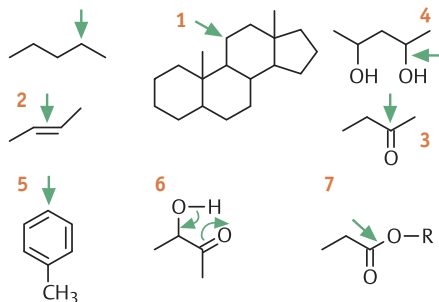
вой кислоты. Липаза из *Pseudomonas cepacia* служит для промышленного производства аминов из предшественников-амидов, липаза из *Serratia marcescens* используется для энантиоселективного гидролиза оксирана — предшественника дилтиазема, применяемого для снижения кровяного давления. С помощью липазы из клеток *Rhizomucor miehei* производят синтетическое масло какао, а ацилазу аминокислот из *Aspergillus oryzae* применяют для энантиоселективного гидролиза N-ациламинокислот.

ЛИАЗЫ. К лиазам относятся ферменты, которые разрывают связи C-C , C-O , C-N и др., при этом не требуется наличия кофакторов. К настоящему времени описано более 300 лиаз. Аспартазу из *E. coli* используют для промышленного производства L-аспарагиновой кислоты из фумаровой. Процедура очистки фермента требует дополнительных затрат, поэтому в промышленности используют целые клетки *E. coli*, а не выделенный фермент. Акрilonитрилгидратаза из *Pseudomonas chloraphis* катализирует присоединение молекулы воды к акрилонитрилу. В результате этой реакции образуется акриламид — важнейший продукт для получения полимера полиакриламида. Оксинитрилазы обеспечивают стереоселективное присоединение HCN к альдегиду; при гидролизе нитрила образуются D- или L-аминокислоты. Альдолазы, выделенные, к примеру, из печени кролика, используются при стереоселективном синтезе гексоз из С3-компонентов.

ИЗОМЕРАЗЫ. Известно около 140 ферментов, относящихся к классу изомераз. Ферментам этого типа не требуется кофактор. Изомеризация D-глюкозы и D-фруктозы, катализируемая глюкозоизомеразой, является важнейшим процессом в производстве искусственных подсластителей. Этот фермент внутриклеточный, и для этой реакции, как правило, используют дезактивированные иммобилизованные клетки *Streptomyces*.

ЛИГАЗЫ. К классу лигаз, их известно 117, относятся ферменты, катализирующие соединение двух молекул, сопряженное с гидролизом АТФ. Теоретически использование лигаз в технологическом процессе весьма перспективно, однако необходимо найти дешевые пути синтеза кофактора — АТФ. Такие системы разрабатываются в лабораторных условиях, но пока не находят применения в технологических процессах.

Ферменты в химическом синтезе



Преимущества ферментов в реакциях химического синтеза

- 1 Стере- и субстрат-специфичное окисление неактивированных С–Н групп
- 2 Стереоселективные реакции присоединения по активированным двойным связям
- 3 Стереоселективное восстановление карбонильных групп
- 4 Стереоселективное восстановление гидроксильных групп
- 5 Субстрат-специфичное замещение в ароматических соединениях
- 6 Субстрат-специфичная изомеризация
- 7 Субстрат-специфичные и стереоселективные реакции гидролиза и этерификации

Ферменты в биокатализе

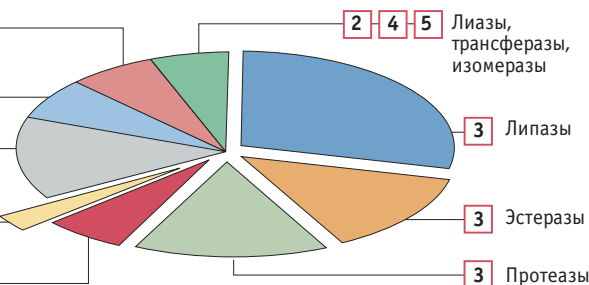
Пероксидазы и оксигеназы **1**

В том числе:
Очищенные ферменты **1**

Оксидоредуктазы (целые клетки) **1**

Другие гидролазы **3**

Нитрилазы **3**



1 Оксидоредуктазы

2 Трансферазы

3 Гидролазы

4 Лиазы

5 Изомеразы

6 Лигазы

2-4-5 Лиазы, трансферазы, изомеразы

3 Липазы

3 Эстеразы

3 Протеазы

Примеры использования ферментов в технологических процессах

Реакция	Фермент	Ежегодное потребление, т	Фирма-производитель
3 Расщепление пенициллина G с образованием 6-аминопенициллановой кислоты	Пенициллинамидаза* из <i>E. coli</i>	40 000	North China Pharmaceuticals
3 Расщепление рацемата N-ацил-DL-аминокислот с образованием L-аминокислот	Ацилаза* из <i>Aspergillus sp.</i>	5 000	Tanabe Seiyaku, Degussa, DSM
4 Обработка NH ₃ фумаровой кислоты с образованием L-аспарагиновой кислоты	Аспартаза* из <i>E. coli</i>	10 000	Tanabe Seiyaku
3 Гидролиз крахмала до D-мальтозы и D-глюкозы	α-Амилаза, глюкоамилаза	100 000	Различные фирмы
5 Изомеризация D-глюкозы в D-фруктозу	Глюкозоизомераза* из <i>Streptomyces sp.</i>	100 000	Clinton Corn Products
3 Синтез акриламида из акрилонитрила	Нитрилгидратаза* из <i>Pseudomonas chloraphis</i>	30 000	Nitto Chemicals
3 Расщепление рацемата фенилэтиламина	Липаза* из <i>Pseudomonas cepacia</i>	10 000	BASF
3 Трансэтерификация пальмового масла и метилового эфира стеариновой кислоты с образованием масла какао	Липаза* из <i>Rhizomucor miehei</i>	1000	Unilever
3 Дегалогенирование 1-хлорпропандиола	Дегалогеназа* из термофильных организмов	Технология разрабатывается	Dow Chemicals

* Имобилизованный фермент.

Ферменты в клинических анализах

ВВЕДЕНИЕ. При клинической диагностике важную роль играют лабораторные анализы, где широко применяются ферменты различных классов. При этом используется свойство фермента специфически катализировать реакцию, в которой участвует лишь один компонент сложной среды. Чтобы получить правильный результат анализа, в ферментном препарате должны отсутствовать другие активности; поэтому к степени очистки ферментов, применяемых при проведении клинических анализов, предъявляются очень жесткие требования. Анализы большого числа проб проводят с помощью лабораторных автоматических анализаторов, тест-полосок или биосенсоров. Ферменты также применяются в качестве репортерных соединений (маркеров) в реакциях специфического связывания антител или нуклеиновых кислот (иммунный или ДНК-анализ): в присутствии избытка субстрата ферменты значительно увеличивают интенсивность сигнала. Объем рынка ферментов, используемых в целях медицинской диагностики, составляет около 6 млрд долл. США в год.

МЕТОДЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ. В ферментативном анализе чаще всего используются фотометрические, флуориметрические или люминометрические методы регистрации продукта реакции. Если продукт реакции нельзя определять непосредственно, используют дополнительные ферменты, так называемую сопряженную систему ферментативных реакций, продукты которых можно зарегистрировать. Например, в гидроксилазной реакции за восстановлением NAD(P)H можно наблюдать на длинах волн 334, 340 или 366 нм. Современные спектрофотометры позволяют проводить измерения в очень малых объемах образца (несколько микролитров).

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ. Ферментативные методы делятся на следующие:

- а) метод конечной точки титрования;
- б) кинетический метод;
- в) метод ферментативного катализа.

Конечная точка титрования дает возможность определения количества субстрата или косубстрата, которое полностью превратилось в продукт. Так с помощью алкогольдегидрогеназной реакции определяют содержание спирта, а с помощью лактатдегидрогеназной — лактата. Такой анализ выполняется всего за несколько минут. Окончание реакции (конечная точка) достигается тем быстрее, чем меньше K_m или чем больше V_{max} , т. е. пока концентрация субстрата самая высокая. Примером определения концентрации субстрата по продукту сопряженной реакции является ферментативное определение глюкозы с помощью гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Другой, значительно более быстрый

метод определения глюкозы — кинетический. При этом анализируют не конечные продукты реакции, а измеряют начальную скорость реакции (метод начальных скоростей). Когда концентрация субстрата значительно ниже K_m (менее 1/10), скорость реакции линейно зависит от концентрации субстрата. При таком методе анализа особенно важно соблюдать постоянные условия реакции, поэтому этот метод лежит в основе действия автоматических анализаторов. Каталитический метод анализа основан на том, что количество анализируемого вещества является лимитирующим фактором в циклическом каталитическом процессе, в котором оно разлагается в ходе одной ферментативной реакции и образуется в ходе другой. Количество анализируемого вещества определяют по изменению количества одного из участников циклического процесса. Так определяют, например, концентрацию КоА в сопряженных реакциях, катализируемых фосфотрансацилазой, цитратсинтазой и малатдегидрогеназой.

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА. Объемы производства ферментов, используемых в медицине при проведении лабораторных анализов, невелики, однако эти препараты ферментов должны иметь очень высокую чистоту. Обычно это внутриклеточные белки, которые образуются в клетке в малых количествах, поэтому для их выделения и очистки используют специальные методы. К настоящему времени получено много рекомбинантных штаммов-суперпродуцентов. Методами генетической инженерии в ген фермента могут быть внесены изменения, и такой белок будет обладать свойствами, оптимальными для своего выделения и применения. Наряду с чистотой и высокой специфичностью фермент должен оставаться активным в течение достаточно продолжительного времени, поэтому в препарат добавляют различные стабилизаторы, благодаря чему при хранении при температуре до +40 °С ферменты теряют менее 20% активности в год.

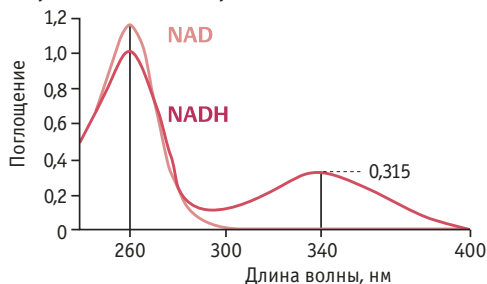
Ферменты, применяемые при проведении лабораторных клинических анализов

Фермент	ЕС-номер	Анализируемое вещество	Детектируемое вещество
Алкогольдегидрогеназа	1.1.1.1.	Этанол, другие спирты, альдегиды	NADH
Глюкозооксидаза	1.1.3.4.	Глюкоза	Окраска
Пируваткиназа	2.7.1.40	Фосфоенолпируват, АДФ	
Креатинкиназа	3.5.3.3.	Креатинин	
Цитратлиаза	4.1.2.6.	Лимонная кислота	NAD ⁺
Маннозо-6-фосфатизомераза	5.3.1.8.	Манноза	
Сукцинил-КоА-синтетаза	6.2.1.4.	Сукцинат	

Методы детектирования

Метод	Чувствительность метода, ммоль/л
Фотометрический	
– по продукту реакции	10^{-6} – 10^{-5}
– кинетический	10^{-7} – 10^{-6}
– каталитический	10^{-9} – 10^{-8}
Флуориметрический	
– по продукту реакции	10^{-9} – 10^{-8}
– каталитический	10^{-15} – 10^{-14}
Люминометрический	10^{-13} – 10^{-8}

Определение концентрации NADH



Определение концентрации субстрата по количеству продукта реакции

а

Этанол + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{Алкоголь-дегидрогеназа}}$ Ацетальдегид + NADH + H⁺

Лактат + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{Лактат-дегидрогеназа}}$ Пируват + NADH + H⁺

Прямое определение продукта или NADH

б

Глюкоза + АТФ $\xrightarrow{\text{Гексокиназа}}$ Глюкозо-6-фосфат + АДФ

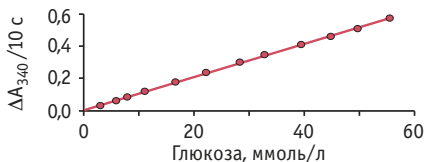
Глюкозо-6-фосфат + NADP⁺ + H₂O $\xrightarrow{\text{Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа}}$ 6-Фосфоглюконат + NADPH + H⁺

Определение количества продукта реакции в сопряженных реакциях: с высокоспецифичной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и с менее специфичной гексокиназой

 Определяемое соединение (аналит)
 Вещество, концентрацию которого можно измерить

Кинетический метод

Кинетический метод определения глюкозы с использованием гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы NADPH через 10 с после добавления фермента в анализатор



Уравнение Михаэлиса–Ментен:

$$v = v_{\max} \times [S] / (K_m + [S])$$

При концентрации субстрата [S], когда $[S] \ll K_m$ (K_m – константа Михаэлиса, характеризует сродство фермента к субстрату), скорость в ферментативной реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата [S].

Количество фермента и K_m

Аналит	Фермент	K_m , ммоль/л	v/K_m , МЕ/л*
АДФ	Аденилаткиназа	$1,6 \cdot 10^{-3}$	1600
Глюкоза	Гексокиназа	$1,0 \cdot 10^{-4}$	100
Глицерин	Глицеринкиназа	$5,0 \cdot 10^{-5}$	50
Мочевая кислота	Уратоксидаза	$1,7 \cdot 10^{-5}$	17
Фумаровая кислота	Фумараза	$1,7 \cdot 10^{-6}$	1,7

Чем выше K_m , тем больше фермента необходимо добавить к пробе, для того чтобы за несколько минут в продукт превратилось 99% субстрата.

Тесты с помощью ферментов

ВВЕДЕНИЕ. Развитие методов ферментативного анализа, иммуноанализа, а в последние годы и анализа ДНК значительно расширило возможности клинической диагностики. Лабораторные исследования плазмы крови с помощью ферментов позволяют определить в ней концентрацию низкомолекулярных метаболитов, например глюкозы или молочной кислоты. При выявлении различных патологий для определения концентрации ферментов в сыворотке крови применяют также высокоспецифичные индикаторы. Так же стремительно развиваются ферментативные методы анализа пищевых продуктов и экологического состояния окружающей среды. Первые методы определения концентрации низкомолекулярных соединений были основаны на реакциях, катализируемых гидрогеназами: NAD(P)^+ и NAD(P)H имеют разные спектры поглощения, которые регистрируются спектрофотометрически (оптические тесты). Таким способом можно напрямую оценивать концентрацию глюкозы и этанола в растворе, а для определения количества жирных кислот и глицерина используют сопряженные реакции. Из соображений практического характера при проведении многофакторного ферментативного анализа, как правило, стараются использовать максимальное количество реакций, за ходом которых можно наблюдать спектрофотометрически. При анализе пищевых продуктов ферменты служат для определения концентраций различных сахаров (глюкозы, галактозы, мальтозы) и кислот (лимонной, пропионовой). Непрерывное определение концентрации глюкозы при микробной ферментации или содержания лактата при культивировании животных клеток — необходимые меры контроля в промышленных биотехнологических процессах. Ингибирование активности ферментов также используется в анализе: например, ингибирование ацетилхолинэстеразы, участвующей в процессе передачи нервного импульса, свидетельствует о наличии в исследуемом продукте инсектицидов (фосфоорганических соединений, карбаматов).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ в сыворотке крови — чрезвычайно важный метод клинической диагностики. Для различных клеток (сердца, мышц, печени) и клеточных компартментов характерно наличие определенного набора ферментов, поэтому обнаружение некоторых ферментов в крови может свидетельствовать о патологиях, например, инфаркте, дистрофии, вирусном гепатите, циррозе. Для выявления патологий печени ферментами-«индикаторами» служат трансаминазы, для заболеваний поджелудочной железы — α -амилаза, а присутствие креатинкиназы в крови свидетельствует о перенесенном инфаркте. Опре-

деление активности ферментов-«индикаторов» проводится, как правило, кинетическим методом со специфическими субстратами.

АВТОМАТИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ АНАЛИЗАТОРЫ. Ранее анализы на ферментативную активность проводили на фотометрах, управляемых вручную. Современная лаборатория анализирует огромное число проб, и хотя пробоподготовка производится по-прежнему вручную (например, получение сыворотки крови), благодаря внедрению автоматических анализаторов, оснащенных автоматическими пипетками и компьютеризованной системой обработки данных, анализы выполняются очень оперативно. Производительность таких анализаторов может превышать 1000 проб в час.

ТЕСТ-ПОЛОСКИ позволяют провести ферментативный анализ биологического материала прямо на месте (у постели больного) и, если это необходимо, оказать неотложную помощь. Исследуемую жидкость (например, кровь) наносят на многослойную полоску, на которую нанесены компоненты ферментативной реакции, подготовленные таким образом, чтобы результат можно было наблюдать по изменению цвета в определенной зоне полоски. Часто в качестве фермента на тест-полосках используют оксидазу: продукт этой реакции — пероксид водорода — окисляет вещество, изменяющее цвет при окислении. Вспомогательным ферментом, который катализирует реакцию окисления, служит пероксидаза. Результаты теста можно увидеть невооруженным глазом или измерить на фотометре.

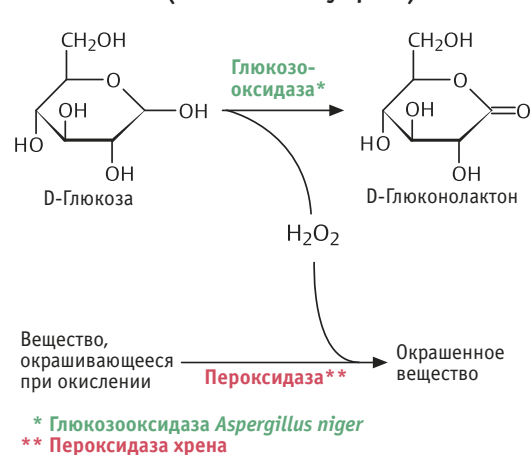
Примеры ферментативных тестов

	Анализируемые вещества/ферменты	Область применения
Клинический анализ	Глюкоза	Диабет
	Триглицериды, холестерол	Риск возникновения атеросклероза
	Мочевая кислота	Подагра
	Кислые и щелочные фосфатазы	Опухоли
	Трансаминазы	Поражения печени
	Креатинкиназа	Инфаркт
Анализ пищевых продуктов	Сахара (глюкоза, мальтоза)	Контроль качества
	Кислоты (цитрат, пропионовая кислота)	Контроль качества, борьба с фальсификацией
Контроль биотехнологических процессов	Глюкоза, молочная кислота	Контроль за ходом ферментации
Контроль экологического состояния	Ингибирование холинэстеразы	Наличие фосфорорганических соединений, карбаматов

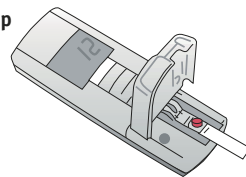
Дифференциальная диагностика заболеваний различных органов



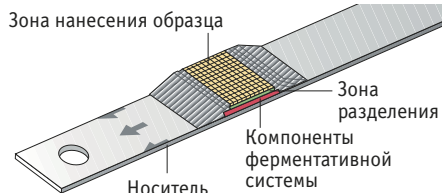
Тест-полоски (тест на глюкозу крови)



Портативный прибор для определения уровня глюкозы крови



Тест-полоска



Применение ферментов в промышленных технологиях

ВВЕДЕНИЕ. Ферменты чрезвычайно широко используются в промышленных технологиях, например в производстве стиральных порошков, пищевых продуктов, бумаги, текстиля и кожаных изделий. Многие реакции химического синтеза в промышленности также протекают с участием ферментов, так как по сравнению с традиционными катализаторами ферменты обладают большей специфичностью. Кроме того, в настоящее время, когда многие ферменты доступны в виде рекомбинантных белков, их использование становится экономически выгодным, чем и объясняется стремительное развитие методов ферментативного анализа для диагностики и контроля качества пищевых продуктов. Гены многих ферментов клонированы, а методы белковой инженерии позволяют оптимизировать свойства белков с целью их аналитического или промышленного применения. Как правило, из-за высоких цен на кофакторы в промышленности «работают» ферменты, не требующие кофакторов: гидролазы, лиазы, изомеразы и некоторые оксидоредуктазы.

С КАКОЙ ЦЕЛЬЮ ПРИМЕНЯЮТСЯ ФЕРМЕНТЫ? Во всех отраслях промышленности, когда необходимо повысить качество продукции и снизить затраты на производство, могут быть использованы ферменты. Протеазы в составе стирального порошка удаляют белковые загрязнения с волокон тканей эффективнее, чем любые другие компоненты современных моющих средств. При ферментативном расщеплении крахмала образуется значительно меньше побочных продуктов, чем при проведении кислотного гидролиза. При изготовлении фруктовых соков использование ферментов позволяет значительно увеличить эффективность переработки фруктов. В кожевенной промышленности действие протеаз и коллагеназ помогает освободить шкуру животного от волос и других «излишеств»; использование ферментов позволило значительно улучшить условия труда работников этого весьма экологически грязного производства. Традиционно для створаживания молока использовали сычужный фермент (экстракт из сычуга крупного рогатого скота). В современном сыроварении «работает» рекомбинантный сычужный фермент, что значительно сокращает длительность процесса и улучшает санитарногигиенические условия производства. В отличие от высокоспецифичных аналитических реакций, во всех этих биотехнологических процессах принимает участие множество сложных, зачастую недостаточно полно охарактеризованных соединений. Из экономических соображений в промышленных процессах, как правило, используют почти неочищенные ферментные препараты, обладающие рядом дополнительных активностей. Часто процедура очистки основного продукта от побочных продуктов, образо-

вавшихся из-за наличия примесей в ферментном препарате, обходится дешевле, чем если бы проводилась дополнительная очистка исходного фермента. При оценке применимости ферментного препарата в промышленном процессе учитывают не только его биохимические характеристики, но и производственные традиции. Поэтому при поиске ферментных препаратов с улучшенными качествами действуют особые критерии, так что не всегда более активный препарат выигрывает при сравнении с уже известным ранее и используемым аналогом.

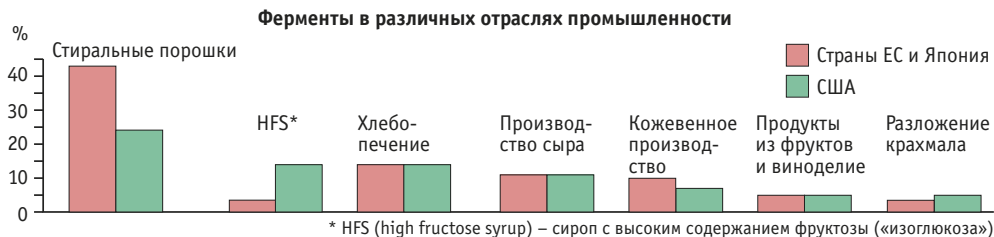
ПРОИЗВОДСТВО ФЕРМЕНТОВ. Производство применяемых в промышленности ферментов контролируется согласно «Правилам организации производства и контроля качества» (Good Manufacturing Practice). Ферменты, полученные или модифицированные методами генетической инженерии, чаще всего идут на производство стиральных порошков. Для продуктов с ограниченным потребительским спросом затраты на сертификацию часто превышают прибыль от продажи рекомбинантного продукта, поэтому случаи сертификации таких продуктов относительно редки. Одно из исключений — рекомбинантный химозин — фермент, использующийся в производстве сыра.

ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ. Экономический эффект использования ферментативной технологии зависит от цены фермента и рыночной цены продукта. Одна тонна неочищенного и достаточно чистого фермента может стоить от нескольких центов до нескольких долларов. За последние 10 лет объем рынка ферментов вырос на 50% и составляет около 1,8 млрд долларов США.

Применение ферментов в промышленных технологиях

Область применения	Фермент(ы)	Источник (некоторые), из которого выделен фермент	Доля на рынке ферментов, %	Назначение фермента
Производство стиральных порошков	Протеазы Липазы Целлюлазы	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Trichoderma reesei</i>	40	1
Расщепление крахмала	α -Амилаза	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5	3, 4
Изомеризация глюкозы	Глюкозоизомераза	<i>Streptomyces venezuelae</i>	7	1, 3
Пивоварение*	Амилазы	<i>Bacillus subtilis</i>	5	3, 4
Переработка овощей и фруктов, виноделие	Целлюлазы Гемичеселлюлазы Пектиназы	<i>Aspergillus niger</i>	7	3, 4, 5, 6
Хлебопечение	α -Амилаза Протеазы	<i>Aspergillus oryzae</i>	10	1, 3
Производство сыров	Протеазы Химозин Липазы	Сычужный фермент, <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	2
Силосование и производство кормов	Целлюлазы	<i>Aspergillus niger</i>	2	3
Производство бумаги и текстильная промышленность	α -Амилаза	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	4
Кожевенная промышленность	Протеазы	<i>Aspergillus oryzae</i>	10	1, 7

* В Германии не используется



Применение	Цена
Получение крахмального клейстера	~ 2 долл. США/т крахмала
Осахаривание	3,5 долл. США/т крахмала
Изомеризация	6 долл. США/т крахмала
Получение «изоглюкозы» в США (1986)	6–7 долл. США/т крахмала
Получение спирта (1984)	1 долл. США/т крахмала
Пивоварение	10 цент./100 л спирта
Хлебопечение США	5–10 цент./100 кг муки
Европа	5–50 цент./100 кг муки
Изготовление фруктовых соков	5–10 цент./100 л сока
Виноделие	5–10 цент./100 л вина
Изготовление лимонадов	26–79 цент./1000 л
Производство сыров	5 цент./100 л молока
Производство стиральных порошков	4–6 цент./кг стирального порошка
Кожевенное производство	1,2–3 долл. США/т кожи

С какой целью применяют ферменты?

- 1 Повышение выхода продукта
- 2 Улучшение вкусовых качеств
- 3 Более продуктивная переработка
- 4 Снижение затрат на производство
- 5 Улучшение фильтруемости
- 6 Консервирование продукта
- 7 Снижение количества экологически вредных отходов

Ферменты в производстве моющих средств

ВВЕДЕНИЕ. Около 100 лет назад Отто Рем создал первый стиральный порошок с добавлением панкреатических ферментов; это моющее средство хорошо удаляло с тканей загрязнения белковой природы (пятна крови, какао, травы и др.). В 1960-е гг. после разработки технологии получения щелочных протеаз из штаммов *Bacillus* производство стиральных порошков стало стремительно развиваться. Методами *белковой инженерии* эти протеазы были усовершенствованы специально для использования в моющих средствах. Мировое производство рекомбинантных протеаз из *Bacillus* превышает 1000 тонн в год. В состав стиральных порошков и моющих средств для посудомоечных машин могут входить и ферменты других классов — целлюлазы, липазы, амилазы, гликозиллипазы, манназы, пектат-лиазы, протеазы и амилазы.

УДАЛЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ СТИРАЛЬНЫХ ПОРОШКОВ. Стиральные порошки содержат, как правило, анионные и неионные, а в некоторых случаях и катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ). В жесткой воде из-за взаимодействия с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} анионные ПАВ теряют активность и выпадают в осадок, поэтому к стиральным порошкам добавляют смягчители, понижающие жесткость воды. Ранее для смягчения воды использовался фосфат натрия, а сейчас — натрий-алюминиевые соли кремниевой кислоты (силикаты), а также в небольших количествах органические лиганды-комплексобразователи (лимонная кислота и фосфонат). В качестве отбеливателей добавляются перкарбонат натрия и активаторы (например, тетраацетилэтилендиамин, ТАЭД) — при стирке образуются органические пероксикислоты. Раствор стирального порошка имеет pH ~10,0, процесс стирки, как правило, занимает 30 мин при температуре от 30 до 90 °С, следовательно, входящие в состав стирального порошка ферменты должны быть устойчивы в щелочных условиях и при повышенной температуре (вплоть до 60 °С), а также быть достаточно устойчивыми к действию комплексообразователей, окислителей и ПАВ. Ферменты, входящие в состав стиральных порошков, имеют низкую специфичность.

ПРОТЕАЗЫ. В стиральных порошках и моющих средствах используются исключительно сериновые протеиназы (субтилизины), выделенные из штаммов *Bacillus*. Сегодня методами генетической инженерии получены штаммы-суперпродуценты протеиназ. Путем направленного мутагенеза удалось получить протеиназы, устойчивые к действию комплексообразователей и окислителей. В ходе ферментации на определенной стадии клеточного роста в среду добавляют промотор-специфические индукторы, стимулирующие синтез протеиназ, гены которых находятся

под контролем этих промоторов. Длительность процесса не превышает 72 ч. Затем клеточную массу отделяют в специальных сепараторах или отфильтровывают (чаще всего используется мембранная технология); протеиназы (внеклеточные ферменты) очищают и концентрируют осаждением или ультрафильтрацией. При попадании в дыхательные пути протеиназы могут вызывать аллергические реакции, поэтому их добавляют в стиральные порошки в виде гранул. Для этого к концентрату фермента в высокоскоростном смесителе и экструдере добавляют соли, воск, стабилизаторы; при сушке в кипящем слое образуются гранулы («капсулы»), покрытые воском и пигментом. Согласно исследованиям, протеазы в такой форме безопасны для здоровья и не вызывают аллергических реакций.

ЦЕЛЛЮЛАЗЫ. При определенных pH целлюлазы эндодействия катализируют гидролиз целлюлозы хлопчатобумажных тканей. В результате ткань становится более мягкой, а краски более яркими. Кроме того, целлюлазы эффективны при удалении различных пятен. В стиральные порошки добавляют целлюлазы из клеток *Humicola insolens*, *Bacillus sp.*, *Melanocarpus sp.* и *Thielavia sp.*, клонированных в *Aspergillus oryzae* или *Bacillus subtilis*.

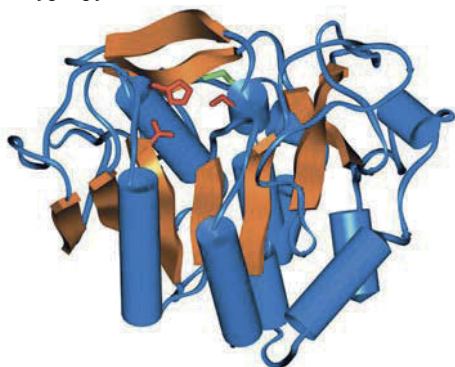
ЛИПАЗЫ. Эффективность липаз связана с тем, что, кроме расщепления триглицеридов, эти ферменты катализируют расщепление эфиров длинноцепочечных кислот, присутствующих в таких трудноудаляемых загрязнениях, как следы от губной помады. Чаще всего в стиральные порошки добавляют липазы из клеток *Humicola insolens* или рекомбинантных штаммов *Aspergillus oryzae*.

АМИЛАЗЫ. Амилазы удаляют крахмалсодержащие загрязнения. В некоторые стиральные порошки и моющие средства добавляют термостабильные амилазы, устойчивые в щелочных условиях. Их получают из рекомбинантных штаммов *Bacillus*, в которых в гене амилазы произведена замена некоторых остатков метионина.

Использование протеиназ в производстве стиральных порошков

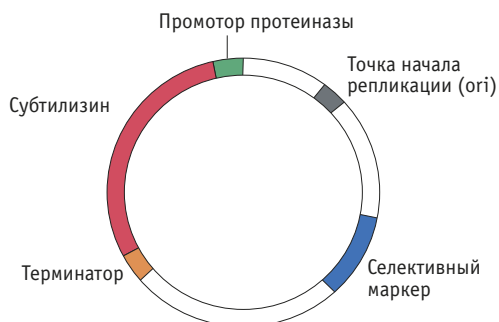
Тип протеиназы	Сериновые протеиназы	Цистеиновые протеиназы	Карбокси-пептидазы	Металло-протеиназы
Пример	Субтилизин	Папаин	Пепсин	Термолизин
Активность при pH 10	+	-	-	-
Стабильность при pH 10	(+)	-	-	-
Стабильность при 50°C	+	-	-	+
Устойчивость против комплексообразования	+	+	+	-
Устойчивость к окислению	+	-	+	+
Устойчивость к ПАВ	~	~	~	~

Структура



Субтилизин Карлсберга (1scb) (разрешение 0,23 нм). Каталитический центр (Ser, Asp, His) изображен красным цветом; зеленым цветом обозначен Met²²²

Вектор трансформации



Плазмида для экспрессии субтилизина Карлсберга в штамме-суперпродуcente *Bacillus lentus*

Ферментация и получение

Предферментация

Генетически модифицированные штаммы-суперпродуценты *Bacillus lentus*; 10 м³, 24 ч при 35 °С

Основной процесс

120 м³, 48 ч при 35 °С, источник углерода – декстрин, источник азота – соевая мука; добавление казеина как индуктора

Более 15 г/л субтилизина через 60 ч

Отделение клеток и концентрирование

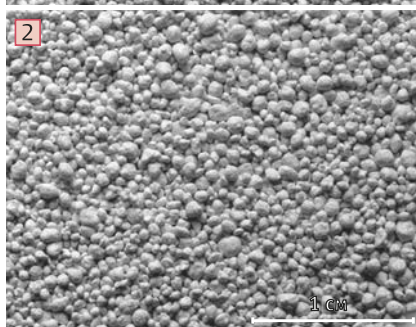
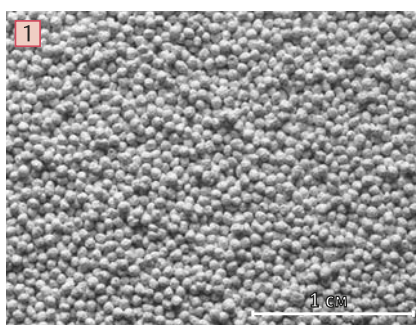
Микрофилтрация и ультрафилтрация, осаждение

1 Гранулирование

Мелкие твердые частички (соль/сахар), ловушка радикалов, высушивание, гранулы покрыты ПЭГ*/TiO₂

2 Гранулирование в смесителях

Мелкие твердые частички (соль/ПЭГ), гранулирование в специальных смесителях, высушивание, гранулы покрыты ПЭГ/TiO₂



* ПЭГ – полиэтиленгликоль

Ферменты, расщепляющие крахмал

ВВЕДЕНИЕ. Крахмал является вторым по значимости полисахаридом после целлюлозы; это также один из самых важных компонентов питательных сред для ферментации. Объем производства крахмала составляет 50 млн т, около 70% — из кукурузы, 20% — из картофеля. Лишь около 20% крахмала используется в чистом виде, 30% подвергается химической модификации, 50% гидролизуется до олигомерных полисахаридов (декстринов) и D-глюкозы. Вместо кислотного гидролиза чаще проводят ферментативный, при котором меньше побочных процессов.

КРАХМАЛ — это высокомолекулярное соединение (степень полимеризации 200–5000) из линейных молекул амилозы (поли- α -1,4-D-глюкоза) и разветвленных цепей амилопектина. Псевдокристаллическая амилоза в воде образует не растворы, а гидратированные мицеллы; при добавлении иода происходит синее окрашивание — качественная реакция на крахмал. В амилопектине линейные цепи из остатков глюкозы, как в амилозе, приблизительно через каждые 20 остатков имеют характерные точки ветвления, в которых остатки глюкозы соединены α -1,6-связями. В зависимости от источника крахмала соотношение амилозы и амилопектина может различаться и от этого зависят физические и химические свойства крахмала. Крахмал не растворяется в холодной воде. При нагревании в крахмале рвутся водородные связи, и растворимость крахмала немного увеличивается. Образование клейстера объясняется сильным повышением вязкости раствора в результате включения воды в амилопектин (желирование). В таком виде крахмал можно подвергать химическим модификациям или ферментативному гидролизу. При охлаждении клейстера между молекулами амилозы вновь возникают водородные связи (ретроградация). Крахмал является важным компонентом многих пищевых продуктов, например хлеба или пива. Традиционные технологии крахмала постоянно совершенствуются.

КРАХМАЛРАСЩЕПЛЯЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ. Для ферментативного гидролиза крахмала используются следующие ферменты: α -амилаза (другое название — экзоамилаза) — случайным образом гидролизует внутренние α -1,4-гликозидные связи; β -амилаза (другое название — эндоамилаза) — отщепляет от невосстанавливающего конца полимерной цепи мальтозу или мальтотриозу; глюкоамилаза (по-другому — γ -амилаза, мальтаза, амилоглюкозидаза) — гидролизует мальтозу с образованием двух молекул D-глюкозы и расщепляет с низкой скоростью также α -1,6-гликозидные связи; пуллулаза — селективно расщепляет 1,6-гликозидные связи боковых цепей амилопектина; изоамилазы — катализируют гидролиз α -1,6-гликозидных связей амилопектина.

α -**АМИЛАЗА** обнаружена во многих организмах. Кристаллическая амилаза получена из солода, поджелудочной железы крупного рогатого скота, а также из клеток *Aspergillus oryzae* и *Bacillus subtilis*. Определена кристаллическая структура α -амилазы из *Bacillus amyloliquefaciens*. Гены многих α -амилаз из различных источников клонированы, и путем экспрессии получены штаммы-суперпродукты этого фермента. По сравнению с амилазами, выделенными из клеток грибов, бактериальные α -амилазы значительно более устойчивы при высокой температуре (α -амилаза из *B. licheniformis* активна при 78 °С) и щелочных условиях среды. Таким образом, добавленный в моющее средство фермент определяет рекомендованные условия стирки.

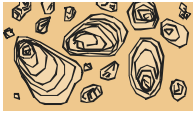
β -**АМИЛАЗУ** можно выделять из мальтозного сиропа — побочного продукта производства пшеничного солода, однако в промышленных целях фермент обычно получают из клеток *Bacillus stearothermophilus*.

АМИЛАЗЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ α -1,6-СВЯЗИ. Наиболее важным представителем этой группы ферментов является гликоамилаза из *Aspergillus niger*; наряду с гликоамилазой используется другой фермент с аналогичной функцией, выделенный из *Rhizopus sp.* Пуллулазу получают из штаммов *Klebsiella pneumoniae* или *Bacillus cereus*.

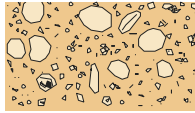
ПОЛУЧЕНИЕ. Все указанные ферменты, имеющие важное значение для промышленности, получают как классическим методом поверхностной ферментации, так и в биореакторах большого объема (до 120 м³). Ферменты выделяются клетками в среду роста, поэтому после отделения клеточной массы культуральная жидкость представляет собой раствор ферментов. Поскольку производство больших количеств ферментов для промышленных нужд является экономически оправданным, если цены на конечный продукт невысоки, процедура очистки ферментов в достаточной мере упрощена: высокоскоростное центрифугирование и осаждение с последующей подготовкой ферментных препаратов к продаже.

Состав и свойства крахмала из различных источников

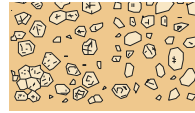
Источник	Амилоза, %	Амилопектин, %	Температура образования клейстера, °С	Способность к набуханию, %
Картофель	18–23	77–82	56–66	> 1000
Пшеница	19–25	75–81	52–63	21
Кукуруза	21–30	70–79	62–72	24
Рис	17–19	81–83	61–78	19



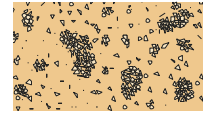
Картофель



Пшеница

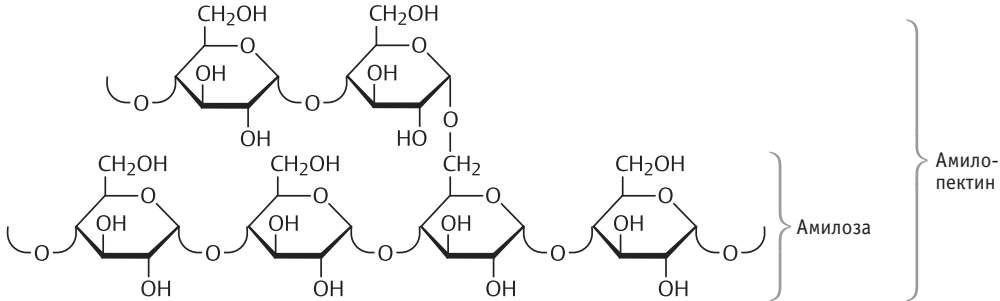


Кукуруза



Рис

Структура амилозы и амилопектина



Ферментативный гидролиз крахмала



Ферменты

Фермент	Источник	Свойства	Условия применения
α-Амилаза	<i>Bacillus licheniformis</i>	Оптимальные условия 60 °С, pH 5,7, необходимо присутствие Ca ²⁺	95–105 °С, pH 6–7, Ca ²⁺
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Оптимальные условия 50–60 °С, pH 5,0, необходимо присутствие Ca ²⁺	< 50 °С, pH > 3,5, Ca ²⁺
	Ячменный солод	Оптимальные условия 70 °С, pH 5,5	< 70 °С, pH > 4,5
β-Амилаза	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Стабильна при 75 °С, pH 5,0	Для получения мальтозного сиропа
Пуллулаза	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Оптимальные условия 70 °С, pH 5,5	55–65 °С, pH 3,5–5
Глюкоамилаза	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus sp.</i>	Стабильна при 70 °С, pH 5,5	55–65 °С, pH 3,5–5

Ферментативное расщепление крахмала в промышленности

ВВЕДЕНИЕ. Объем производства крахмала составляет 50 млн тонн в год, почти половина его подвергается ферментативному гидролизу. При этом 15% используются для получения так называемой изоглюкозы («сиропа с высоким содержанием фруктозы»), а остальной крахмал в виде декстринов и мальтозных сиропов применяется в разнообразных технологических процессах, например как компонент питательной среды для ферментации. В Канаде и США сырьем при получении крахмала служат кукуруза и пшеница. По сравнению с объемом крахмала, выделенного из этих культур, объем картофельного и рисового крахмала незначителен. Во времена Наполеона, когда завоз продуктов, в частности сырья для производства сахара — сахарного тростника, в Европу был ограничен, гидролиз крахмала под действием неорганических кислот был основным способом получения сахара. В современной промышленности эта технология больше не используется.

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ «РАЗЖИЖЕНИЕ» КРАХМАЛА. Кукурузный и пшеничный крахмал получают при перемалывании зерен в сухих или влажных условиях. При этом образуются такие важные побочные продукты, как кукурузное масло, кукурузный (или пшеничный) глютен и компоненты, которые используются для составления кормовых смесей. Крахмал, помещенный в реактор объемом более 100 м³, несколько минут подвергают термической обработке паром (105–140 °С) в присутствии термостабильной бактериальной α -амилазы. При инкубации получающегося клейстера в течение 2–3 ч при температуре 95 °С под действием бактериальной α -амилазы крахмал на 98% гидролизует до мальтодекстрина (декстрозный эквивалент DE 15–25) — смеси олигосахаридов, содержащей небольшие количества моно-, ди- и трисахаридов. Мальтодекстрин служит субстратом для дальнейшего осахаривания полисахарида. Кроме того, он используется как компонент детского или диетического питания, а также входит в состав концентратов супов.

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ «ОСАХАРИВАНИЕ». Этот процесс ведет к образованию сиропа, содержащего глюкозу и мальтозу. В ферментативном осахаривании главную роль выполняет фермент глюкоамилаза из *Aspergillus niger*. Мальтодекстрин охлаждают до температуры 60 °С и закисляют среду до pH 4,0. Как правило, непрерывный технологический процесс осуществляется в нескольких резервуарах, чтобы не допустить потери продукта из-за разбрызгивания сиропа. Осахаривание (т. е. полный гидролиз) в присутствии глюкоамилазы продолжается 48–72 ч; продукт — глюкозный сироп с высоким декстрозным эквивалентом, DE 97–98. Добавление пуллулазазы или изоамилазы приводит к еще более высокому

значению DE, а также позволяет снизить расход глюкоамилазы. Использование иммобилизованных ферментов в этом случае неприемлемо из-за замедления диффузии в вязком растворе. Следующим этапом является кристаллизация D-глюкозозомоногидрата. В зависимости от количества глюкоамилазы и продолжительности осахаривания можно получить различные промежуточные продукты гидролиза крахмала: от мальтодекстрина до глюкозы и мальтозы. Глюкозные сиропы с различными значениями DE широко используются в кондитерской промышленности. Для получения мальтозных сиропов применяют α -амилазу, выделенную из *Aspergillus niger*. Такие сиропы обладают рядом привлекательных технологических свойств: они не темнеют, в отличие от многих других растворов полисахаридов, не склонны к кристаллизации, а также обладают повышенной вязкостью.

ЦИКЛОДЕКСТРИНЫ. Под действием циклодекстрин-трансферазы из декстринов образуются пяти-, шести- или семичленные кольца (α -, β - и γ -циклодекстрины соответственно), построенные из остатков глюкозы. Эти вещества хорошо растворимы в воде, при этом размеры кольца настолько велики (0,5–0,75 нм), что в его полости могут разместиться другие молекулы, например витаминов, ароматических соединений или лекарственных средств. Таким образом, циклодекстрины в основном обеспечивают «растворимость» нерастворимых веществ или стабилизацию их взаимодействия с рецепторами. Хиральный пул производных циклодекстринов используется в качестве неподвижной фазы для хроматографического разделения оптически активных веществ. Наибольшее распространение получили β -циклодекстрины. Соответствующий фермент — циклодекстрингликозилтрансфераза (циклодекстриназа) обнаружен в клетках *Bacillus*, обитающих в нейтральных или щелочных условиях. Промышленное получение циклодекстринов из крахмала осуществляется в ферментных реакторах.

Ферментативное расщепление крахмала

1 Гидролиз кукурузного крахмала

40% м/об, деионизованная вода, 20 ppm Ca²⁺, pH 6–6,5, 77–105 °С, 0,15% бактериальной α-амилазы

2 Мальтодекстрины DE 15–20

2–4 ч при 95 °С, бактериальная α-амилаза

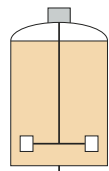
3 Глюкозный сироп DE 97

pH 4,2, 60 °С, 2–3 сут., грибная глюкоамилаза

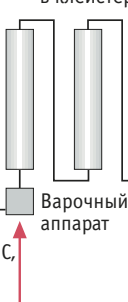
Крахмальное молоко

1 Крахмал набухает и превращается в клейстер

Степень гидролиза возрастает →



Подача водяного пара, 5 мин при 105 °С, термостабильная α-амилаза



↑ Пар

2 Мальтодекстрин

3 ч при 95 °С

2–3 сут. при 60 °С

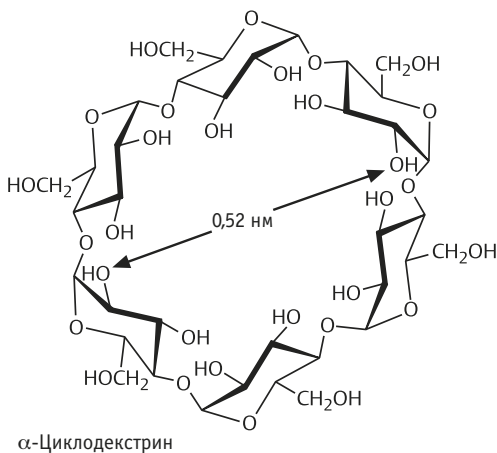
3 Глюкозный сироп DE 97

Продукты ферментативного гидролиза крахмала

Гидролизат	Декстрозный эквивалент, DE*	Фермент	Применение
Мальтодекстрин	15–25	α-Амилаза	В пищевой промышленности, имеет хорошие реологические свойства (текучесть), сырье в производстве подсластителей
Мальтозный сироп	40–45	α-Амилаза, β-амилаза	Подсластитель
Мальтоза	50–55	α-Амилаза, глюкоамилаза	Подсластитель
Мальтозный сироп с высокой и сверхвысокой степенью осахаривания	60–70 < 80	α-Амилаза, глюкоамилаза, пуллулаза	Подсластитель, сырье для ферментации
Изоглюкоза	97	Глюкозоизомераза	Подсластитель

* Декстрозный эквивалент оценивает степень гидролиза крахмала.

Циклодекстрины



Свойства циклодекстринов

Циклодекстрин	α	β	γ
Число остатков глюкозы	6	7	8
M _R	972	1135	1297
Растворимость в воде, 100 г/мл	14,5	1,85	23,2
Диаметр молекулы, нм	≥ 0,47	≥ 0,6	≥ 0,75
Код CAS	10016-20-3	7585-39-9	17465-86-0

Ферментативное превращение сахаров

ВВЕДЕНИЕ. Сахар в нашей пище представляет собой D-сахарозу. В западноевропейских странах сахар начали употреблять в пищу в XVIII в. Изначально его получали из сахарного тростника, произрастающего в тропических и субтропических зонах, но когда при Наполеоне Европа оказалась в экономической блокаде, была разработана технология производства сахара из сахарной свеклы. Использование ферментов в современных производственных процессах позволяет превращать большие объемы кукурузного и пшеничного крахмала в глюкозо-фруктозный сироп («изоглюкоза»). При рациональном питании (низкокалорийный рацион, диета диабетиков, профилактика кармеса) часто используют различные сахарозаменители. Для оценки сладости вещества проводят сравнение с 10% раствором сахарозы.

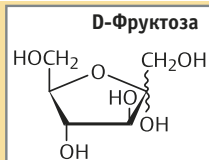
ИНВЕРТИРОВАННЫЙ САХАРНЫЙ СИРОП. Гидролиз сахарозы, катализируемый инвертазой, приводит к образованию смеси равных количеств D-глюкозы и D-фруктозы, называемой инвертированным сахаром. Такой сироп обладает той же сладостью, что и тростниковый сахар, и не кристаллизуется, поэтому его широко используют в кондитерской промышленности при производстве конфет и пралине. Инвертазу выделяют из клеток пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Фермент локализован в цитоплазме, поэтому процедура его выделения относительно проста: после разрушения клеток удается выделить чистый фермент. Технология получения инвертированного сахара из 70% сахарозного сиропа основана на использовании иммобилизованной инвертазы в ферментативном реакторе. Реактор работает в непрерывном режиме в оптимальных условиях в течение нескольких дней при 55 °С.

ИЗОГЛЮКОЗА. Глюкозоизомераза, выделенная из стрептомицетов *Actinoplanes* или *Bacillus coagulans*, катализирует реакцию изомеризации D-глюкозы в D-фруктозу. В оптимальных условиях (60 °С) образуется сироп состава 42% D-фруктозы + 55% D-глюкозы, сладость которого совсем немного меньше, чем сладость сахарозного сиропа. Такой сироп получил название «изоглюкоза 42». После хроматографического выделения глюкозы и ее изомеризации получают сироп с содержанием фруктозы 55% (изоглюкоза 55). Этот продукт используется для производства слабоалкогольных напитков. Изоглюкоза используется более чем в 40% всех напитков и блюд с добавлением сахара, причем более 80% предприятий расположены на территории Северной Америки. В странах ЕС, согласно межгосударственным соглашениям по регулированию экономики, производится только 500 000 тонн фруктозных сиропов в год (менее 5% производимого свекловичного сахара).

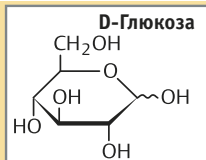
ПОЛУЧЕНИЕ. Глюкозоизомераза обнаружена во многих микроорганизмах. Этот внутриклеточный фермент представляет собой гомодимер. В осуществлении каталитической реакции задействованы ионы Co^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} . На годовое производство в промышленных масштабах глюкозоизомеразы используют 1500 т стрептомицетов и *Bacillus coagulans*. Избежать дорогостоящей процедуры очистки фермента удается при использовании биореактора с иммобилизованными клетками штаммов-производителей глюкозоизомеразы. В биореакторе с притоком воздуха весь процесс заканчивается за 72 ч. Смесь D-глюкозы и D-фруктозы, содержащая 42% D-фруктозы и называемая «изомеразой 42», образуется при 60 °С за 30 мин. Биореактор имеет большое время эксплуатации: «время полужизни» фермента при 60 °С — 50 сут. Модульная конструкция позволяет осуществлять непрерывный процесс, в котором несколько биореакторов участвуют поочередно. В результате генно-инженерной оптимизации штаммы-производители глюкозоизомеразы, в отличие от природных штаммов, не нуждаются в наличии кофактора Co^{2+} . Продукт реакции содержит примеси карамелизованных сахаров, которые удаляют с помощью активированного угля. Фруктозный сироп поступает на предприятия пищевой промышленности в жидком виде.

D-ФРУКТОЗА обладает высоким показателем сладости, ее получают из фруктозного сиропа или инвертированного сахара методом хроматографии. В клубнях топинамбура («земляной груши») содержится до 75% инулина — полимера фруктозы. Гидролиз инулина с образованием фруктозы катализирует фермент инулиназа.

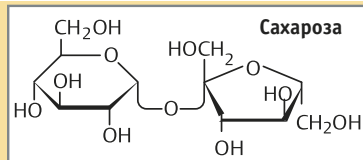
Ферменты и сахара



M_R 180,16
 $T_{пл}$ 106 °C ($T_{разл.}$)



M_R 180,16
 $T_{пл}$ 146 °C ($T_{разл.}$)



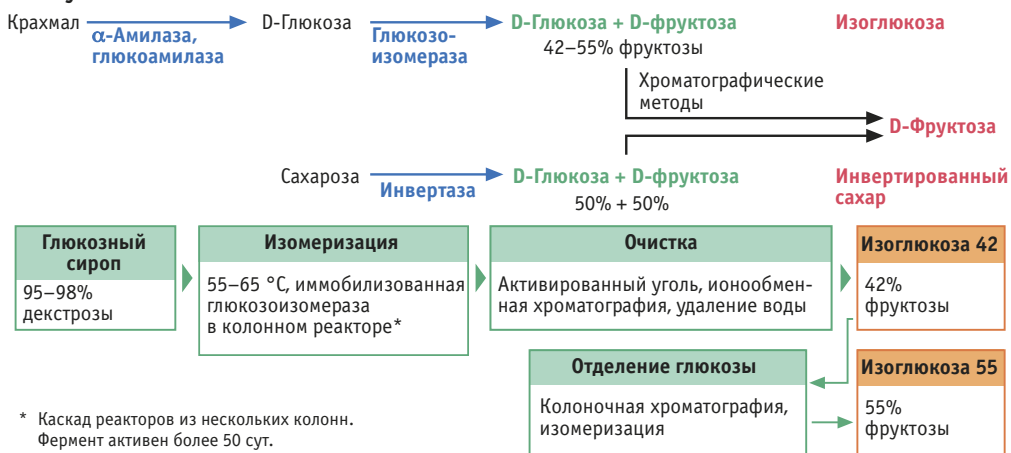
M_R 342,30
 $T_{пл}$ 185–186 °C ($T_{разл.}$ 165 °C)

Продукты углеводного обмена

Название	Относительная сладость (по сравнению с сахарозой)*	Сырье, способ получения
Сахароза	1,00	Сахарная свекла и сахарный тростник
Глюкоза	0,5–0,8	Гидролиз крахмала, катализируемый α-амилазой, глюкоамилазой
Глюкозный сироп	0,3–0,5	Гидролиз крахмала, катализируемый α-амилазой, глюкоамилазой
Гидрированный глюкозный сироп	0,3–0,8	Гидрирование гидролизатов крахмала
Изоглюкоза 42	0,8–0,9	Ферментативная изомеризация глюкозы с глюкозоизомеразой
Фруктоза	1,1–1,7	<ul style="list-style-type: none"> • ферментативный гидролиз сахарозы • ферментативная изомеризация глюкозы • ферментативный гидролиз инулина с последующей хроматографической очисткой
Инвертированный сахар	1,00	Гидролиз сахарозы с помощью инвертазы
Маннит	0,4–0,5	Гидрирование фруктозы
Сорбит	0,4–0,5	Гидрирование глюкозы
Ксилит	1,0	Гидрирование ксилозы
Лактит	0,3	Гидрирование лактозы
Мальтит	около 0,9	Гидрирование мальтозы
Палатинит, изомальт	0,45	Ферментативная изомеризация сахарозы с образованием изомальтулозы (палатинозы), гидрирование смеси глюкопиранозидсорбита и глюкопиранозидманнита

* Сладость оценивают на вкус по сравнению с 10% раствором сахарозы, поэтому этот показатель варьирует

Получение



* Каскад реакторов из нескольких колонн. Фермент активен более 50 сут.

Утилизация целлюлозы и полиозы

ВВЕДЕНИЕ. Целлюлазы и гемицеллюлазы широко применяются в пищевой промышленности при приготовлении пюре из овощей и фруктов. Кроме того, эти ферменты используются в целлюлозно-бумажной промышленности. Некоторые моющие средства также имеют в своем составе щелочные целлюлазы (с целью размягчения целлюлозных волокон хлопчатобумажных тканей). Активно изучается возможность использования целлюлаз и гемицеллюлаз для утилизации биомассы: образующиеся глюкоза и ксилоза могут служить питательными веществами при ферментации с помощью микроорганизмов, например, интенсивно вырабатывающих этанол. Однако на практике такая технология пока не применяется.

ЦЕЛЛЮЛОЗА — основной компонент клеточной стенки растений, самое распространенное в органическом мире соединения. Волокна целлюлозы представляют собой линейную последовательность молекул D-глюкозы (около 10 000), соединенных между собой β -1,4-гликозидной связью. Между линейными цепями образуются водородные связи. Комплекс из 10–100 молекул называется элементарной фибриллой, микрофибриллы состоят из 20–30 таких фибрилл.

ПОЛИОЗЫ (ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЗЫ) — группа короткоцепочечных гетерополимеров, построенных из пентоз, гексоз, дезоксигексоз и гексуриновой кислоты. Клеточная стенка растений на 20% состоит из гемицеллюлоз. В зависимости от состава гемицеллюлозы делятся на три типа: ксиллоглюканы, арабиногалактаны и пентозаны. Ксиллоглюкан (ксилан) построен из остатков глюкозы, соединенных β -1,4-гликозидной связью. Разветвления цепей ксиллоглюканов образованы за счет β -1,6-связей с остатками ксилозы. Ксиллоглюканы связываются с микрофибриллами целлюлозы через водородные мостики. Роль арабиногалактанов, состоящих из арабинозных и галактозных остатков, соединенных β -1,4-связями, заключается в образовании связей с гликопротеинами, входящими в состав клеточной стенки. Пентозаны построены из полимерных цепей арабинозы и ксилозы.

БИОДЕГРАДАЦИЯ. В природе разложение целлюлозы осуществляют бактерии и грибы. Среди последних особая роль принадлежит белым плесневым грибам, которые могут гидролизовать целлюлозу и полиозы, одновременно окисляя лигнин. В сложной реакции, в результате которой происходит разрывление волокон целлюлозы, принимают участие множество ферментов. У некоторых организмов, например клостридий, эти ферменты организованы в целлюлосомы — белковые комплексы, находящиеся на поверхности клеток.

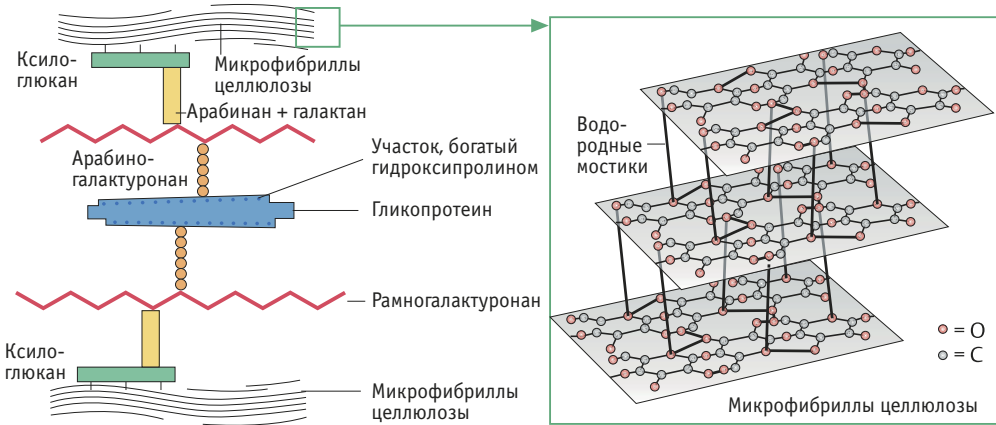
ЦЕЛЛЮЛАЗЫ образуются во многих микроорганизмах. Наиболее хорошо изучены целлюлазы, выде-

ленные из бактерий *Cellulomonas* и *Clostridium*, а также из грибов *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Hemicola insolens*. Получение целлюлаз в биореакторе проводится по стандартной методике выделения внеклеточных ферментов. После отделения клеток и осаждения белков ферментный препарат имеет побочные активности, в частности гемицеллюлазную. Для многих технологических процессов такие препараты имеют преимущество по сравнению с очищенными ферментами. Производство гемицеллюлаз для переработки целлюлозы основано на использовании белого плесневого гриба *Trichoderma reesei*. Как правило, проводят поверхностную ферментацию или проточную ферментацию в биореакторе. В первом случае для обогащения фракции внеклеточных ферментов осуществляют водную экстракцию кожды (см. с. 6), а по окончании ферментации клетки отделяют, а фермент извлекают из культуральной жидкости путем обработки этанолом.

ГЕМИЦЕЛЛЮЛАЗЫ. β -Глюканазы получают из *Bacillus subtilis*, *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger* и других микроорганизмов, манназы и галактоманназы — из *Aspergillus niger* и *Trichoderma reesei* по стандартной технологии выделения внеклеточных ферментов.

ГЛЮКОЗА И КСИЛОЗА. Промышленные отходы, содержащие целлюлозу и полиозы (древесная стружка, багасса и др.), можно разлагать с образованием глюкозы и ксилозы, которые затем добавляют в питательные среды для микробной ферментации. Экономические затраты на этот процесс складываются из расходов на транспортировку продукта, на подготовку субстрата, а также стоимости используемых ферментов. На первом этапе происходит разрушение лигнина термической обработкой или под действием щелочи; при этом полиозы также частично деградируют. Расходы на производство целлюлаз в рамках проекта США «Биомасса для этанола» в 2001 г. были снижены примерно на 80%.

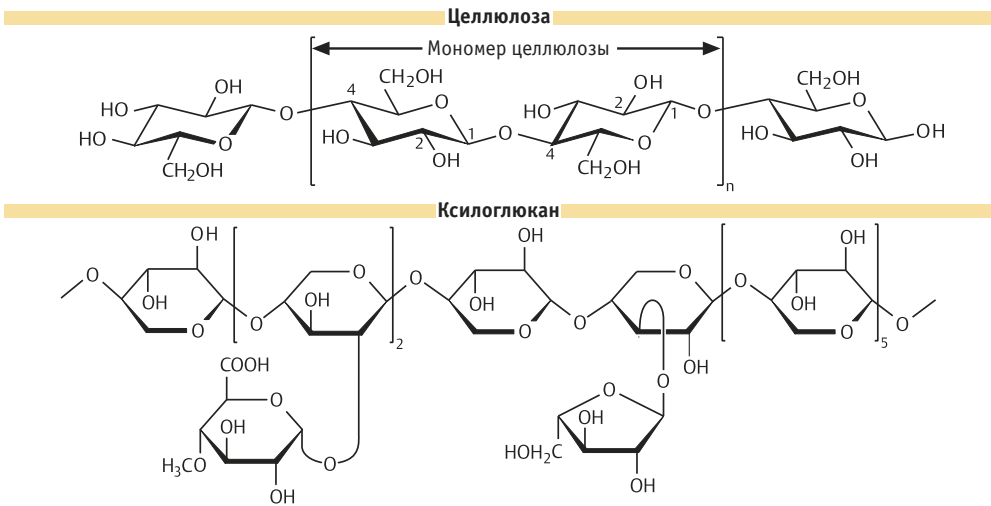
Полисахаридный состав клеточной стенки растений



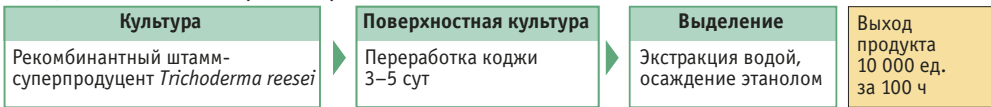
Компонент	Состав	Степень полимеризации	Состав	Содержание в клеточной стенке, %
Целлюлоза	β -1,4-D-Глюкоза	1000–10 000, микрофибриллы	D-Глюкоза	Древесина – 60*, хлопок – 90
Пектин	Полигалактуроновая кислота, рамногалактуронаты, галактаны, арабиногалактаны	100–2000	Галактуроновая кислота, 10–40 метилвые эфиры галактуроновой кислоты, рамноза, арабиноза	
Полиозы (гемицеллюлозы)	Ксиланы, ксилогликаны, β -1,3- и -1,4-D-глюканы, галактоманнаны		Ксилоза, глюкоза, галактоза, манноза	20
Другие полисахариды	Арабиногалактаны, глюкурономаннаны		Галактоза, арабиноза, глюкуроновая кислота, манноза	

* Древесина содержит 40% лигнина

Целлюлоза и ксилан



Получение целлюлаз (пример)



Использование ферментов в целлюлозно-бумажной промышленности

ВВЕДЕНИЕ. Целлюлоза — ценный материал, который получают из древесины в результате удаления полиоз и лигнина. Продукты переработки целлюлозы используются в целлюлозно-бумажной и химической промышленности. В 2004 г. в мире было произведено около 160 млн тонн целлюлозы и 330 млн тонн бумаги и картона, из них более половины — в североамериканских странах на 1 тонну бумаги расходуется 3,3 тонн древесины и 0,4 тонны нефти; сточные воды предприятий целлюлозно-бумажной промышленности очень загрязнены: при производстве 1 тонны целлюлозы в сточные воды попадает 1 кг АОХ и 55 кг ХПК. Таким образом, современное целлюлозно-бумажное производство характеризуется высокими затратами энергии и сырья и загрязняет окружающую среду. Поэтому ведется активная работа по поиску новых технологий в этой области. Свойства конечного продукта — целлюлозы или бумаги — зависят от вида древесины, используемой в качестве сырья, и способа переработки. Эвкалипт и тополь относятся к твердым сортам древесины, они очень быстро растут, однако эта древесина плохо поддается обработке. Мягкая древесина (береза, сосна, ель) построена из более длинных волокон: она хорошо поддается обработке, однако годовой прирост этих деревьев невелик. По сравнению с твердыми сортами мягкая древесина содержит меньше полиоз (14–17%), но больше лигнина (26–32%). Одной из задач современных биотехнологических разработок в области целлюлозно-бумажного производства является снижение содержания лигнина в мягкой древесине путем введения чужеродных генов или с помощью культур растительных клеток.

ПРОИЗВОДСТВО ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МАССЫ. Целлюлозную массу получают механическим, термомеханическим или химическим способом после валки леса, окорки и размельчения в древесную стружку. Чаще всего используется химический способ, когда в условиях высокого давления при 170 °С лигнин деполимеризуется под действием $\text{Na}_2\text{S}/\text{NaOH}$. Этим методом, получившим название крафт-процесса, в мире производится более 80% всей целлюлозы. Другой метод — сульфитный, когда древесная стружка обрабатывается избытком SO_2 . В основе новейших технологий ферментативной деградации лигнина для производства целлюлозы и бумаги лежат естественные процессы гниения.

ПРОЦЕССЫ ГНИЕНИЯ. В настоящее время ведутся исследования возможностей использования микроорганизмов, разрушающих лигнин, прежде всего, белых плесневых грибов для первичной обработки древесины. Примером может служить процесс Cartapip®, разработанный фирмой Clariant Co. Для деградации лигнина в древесные стружки вносят спо-

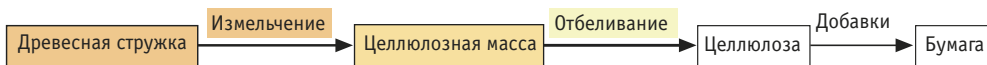
ры белого плесневого гриба *Ophiostoma piliferum* и инкубируют в течение нескольких недель. Технология была отработана в масштабе около 100 тонн; в результате крафт-процесс происходил со значительно большей эффективностью и качество продукта заметно повышалось по сравнению с традиционными методами.

ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ ОТБЕЛИВАНИЯ БУМАГИ. Полученная в результате крафт-процесса или сульфитной обработки целлюлозная масса легко поддается обработке ферментами. Отбеливание массы с помощью ClO_2 позволяет избавиться от нежелательных красящих компонентов. Предварительная обработка целлюлозной массы ксиланазами значительно повышает эффективность отбеливания: при этом снижается расход химикатов и улучшается качество отбеливания. В 1992 г. в странах Северной Европы в эксплуатацию были введены 10 целлюлозно-бумажных комбинатов, на которых бумажная масса перед отбеливанием подвергалась обработке ксиланазами. Общий объем производства составил около 1000 т/сут. Данный метод позволил сократить расход ClO_2 на 5 кг/т массы. Цена фермента составила ~2 долл. США/т целлюлозы и заметной экономической прибыли применение фермента не принесло, однако уровень загрязнения сточных вод снизился примерно на треть. Среди множества изученных ксиланаз чаще используются ферменты из *Clostridium thermocellum* и *Streptomyces roseiscleroticus*, а также рекомбинантный белок, ген которого выделен из термофильного микроорганизма *Thermotoga maritima* и клонирован в клетках *Escherichia coli*. Температурный оптимум для этого фермента составляет около 95 °С. В настоящее время существуют коммерческие препараты ферментов из *Trichoderma longibrachiatum* и *T. reesei*.

КОНТРОЛЬ СМОЛООБРАЗОВАНИЯ. Некоторые сорта древесины, например сосна, содержат повышенное количество триглицеридов, которые в жестких условиях получения целлюлозной массы вызывают осмоление. Использование липаз, выделенных из микроорганизмов, позволяет бороться с этой проблемой. Кроме того, при отбеливании обработанной липазами массы уменьшается образование хлорсодержащих производных триглицеридов.

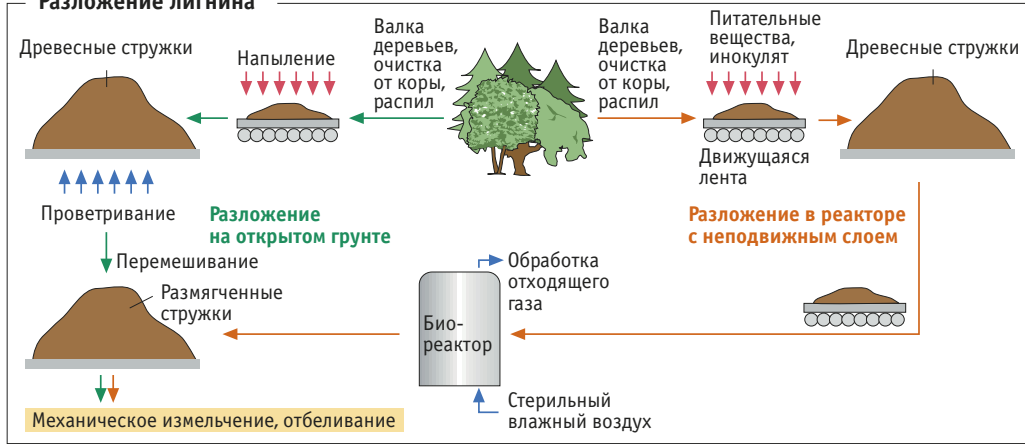
УДАЛЕНИЕ ТИПОГРАФСКОЙ КРАСКИ. На одном из этапов переработки бумажной макулатуры необходимо удалить со старой бумаги печатную типографскую краску. Эту операцию значительно облегчает обработка смесью ферментов, содержащей целлюлазы, ксиланазы и липазы.

Использование ферментов в целлюлозно-бумажной промышленности

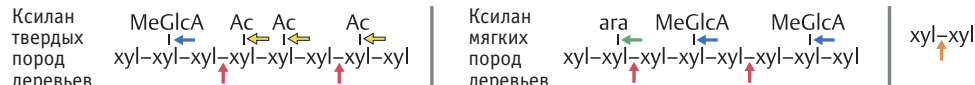


Метод	Условия	Химический процесс	Особенности
Сульфатирование (крафт-процесс)	Na_2S , NaOH , 2 ч, ~ 170 °C, pH 13–14	Разрушение лигнина под действием HS^-	Так получают около 80% целлюлозной массы; в жестких условиях происходит частичное разрушение целлюлозы и полиоз
Сульфирование	SO_2 , HSO_3^- , SO_3^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NH_4^+ , pH 13–14, 1–4 ч, 125–180 °C	Разрушение лигнина в результате сульфирования	По сравнению с крафт-процессом – меньшая степень деградации лигнина
Отбеливание хлором	Cl_2 , OCl^- , ClO_2	Разрушение лигнина и пигментов в результате хлорирования	Образование вредных для природной среды хлорсодержащих продуктов
Отбеливание с использованием O_2^- , H_2O_2^-		Разрушение лигнина и пигментов в результате перокисления	

Разложение лигнина



Ферментативное разложение ксилана и осветление целлюлозной массы

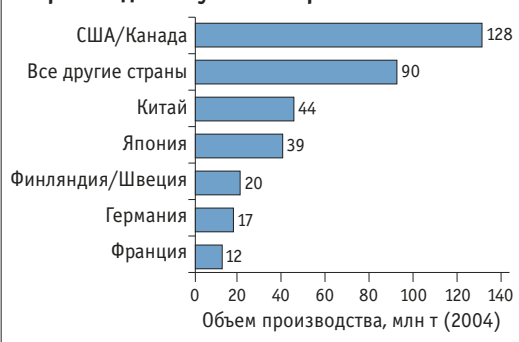


К ксиланазам относятся:

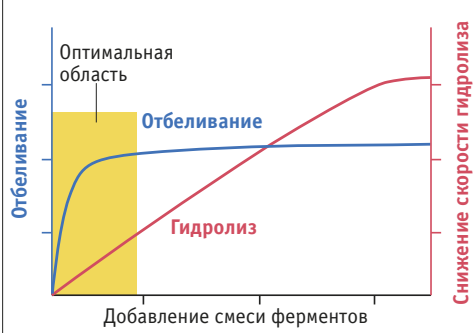
- \rightarrow β -ксиланаза
- \rightarrow β -глюкуронидаза
- \rightarrow α -арабинозидаза
- \rightarrow Эстераза
- \rightarrow β -ксилозидаза

xyl = ксилоза, ara = арабиноза, MeGlcA = 4-0-метил-D-глюкуроновая кислота, Ac = ацетил

Производство бумаги и картона



Повышение эффективности отбеливания в результате предварительного гидролиза



Пектиназы

ВВЕДЕНИЕ. Пектиназы – группа ферментов, которые разрушают пектин и тем самым обеспечивают текстуру и вкусовые качества фруктов и овощей при их созревании. Пектиназы нашли применение при переработке овощей и фруктов; объем мирового производства пектиназ составляет ~1000 т в год.

ПЕКТИНЫ – кислые полисахариды с молекулярной массой 30 000–300 000. Основной структурной единицей пектина являются молекулы метил-D-галактуроновой кислоты, соединенные между собой δ -1,4-связью. Боковые цепи разнообразны по составу: они могут содержать D-арабинозу, D-ксилозу или D-галактозу. Высокомолекулярные пектины, содержащие много эфирных связей, формируют в растительных клетках первичную клеточную стенку, поэтому их называют «клеточным цементом». При гидролизе эфирных связей и деполимеризации образуются короткие цепи пектина, несущие отрицательный заряд. При взаимодействии с ионами кальция эти цепи формируют гелеобразную структуру, в результате чего происходит размягчение растительной ткани. Этот процесс лежит в основе созревания овощей и фруктов. В промышленности гидролиз пектина используется при получении фруктовых и овощных пюре и соков.

ПЕКТИНАЗЫ. К пектиназам относятся следующие ферменты:

1. Эндополигалактуроназы (КФ 3.2.1.15)
2. Экзополлигалактуроназы (КФ 3.2.1.67)
3. Пектатлиаза (КФ 4.2.2.2)
4. Экзопектатлиаза (КФ 4.2.2.9)
5. Пектинлиаза (КФ 4.2.2.10)
6. Пектинэстераза (КФ 3.1.1.11)

Для промышленной переработки овощей и фруктов применяют препарат, содержащий несколько ферментов. Соотношение между количествами ферментов в этой смеси определяет свойства конечного продукта.

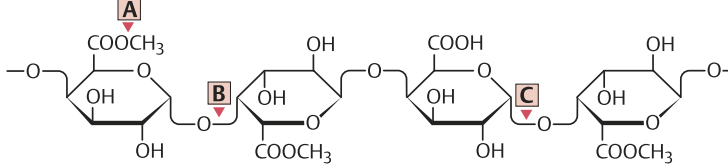
ПРОМЫШЛЕННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ПЕКТИНАЗ. Все пектиновые ферменты, используемые в пищевой промышленности, получают из непатогенных штаммов плесневых грибов (*Aspergillus*, *Rhizopus*). Большинство ферментов синтезируются в поверхностных культурах *Aspergillus* или *Rhizopus*, при этом в качестве питательной среды чаще всего служат пшеничные отруби. Уже через 100 ч культивирования при высокой влажности в питательной среде обнаруживается значительная ферментативная активность. Для выделения фермента применяют экстракцию и ультрацентрифугирование. После стерилизации и добавления стабилизаторов (глицерин, сорбит) препарат готов к использованию. В продажу ферменты поступают в жидком или высушенном виде, а также в виде гранулята. Препараты пектиназ содержат несколько фер-

ментов, поэтому стандартизация пектиназной и других активностей (целлюлазной, гемицеллюлазной, гликозидазной и др.) крайне затруднена. С использованием штаммов, оптимизированных методами генетической инженерии, становится возможным получение вполне определенных ферментов. Отметим, что борьба потребителей против применения генных технологий при производстве продуктов питания затрудняет проведение разработок в этой области.

ПРИМЕНЕНИЕ. Основные области применения пектиназ: а) размягчение овощей и фруктов; б) переработка плодово-ягодной мякоти в соки (яблочный, ягодный) или изготовления вин; пектиназы в этом случае используются для снижения вязкости соков; в) обработка плодов цитрусовых – для предотвращения желирования; г) обработка вина для повышения прозрачности и стабильности. Пример практического использования пектиназ – производство фруктовых и овощных пюре для детского питания и соков с мякотью. За счет добавления пектиназ удается на 5–10% повысить выход сока и значительно облегчить фильтрацию.

ЦЕЛЛЮЛАЗЫ И ГЕМИЦЕЛЛЮЛАЗЫ применяются при получении крахмала из кукурузы, экстракции кофе и чая, а также для переработки овощей и фруктов. В пивоварении добавление глюканаз бактерий или грибов повышает эффективность затирания солода. В Германии, однако, использование ферментов, так же как и любых других добавок при производстве пива, запрещено.

Пектин



- A** Пектинэстераза
- B** Пектинлиаза*
- C** Пектатлиаза*/поли-галактуроназа

* Образуется сахарангидрид

Производство соков (например, виноградного, черносмородинового или яблочного)

Ягоды

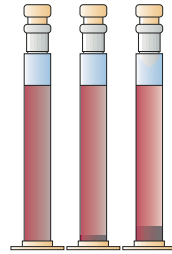
Очистка (водой), освобождение от плодоножек, косточек, измельчение, получение жома

Мезга

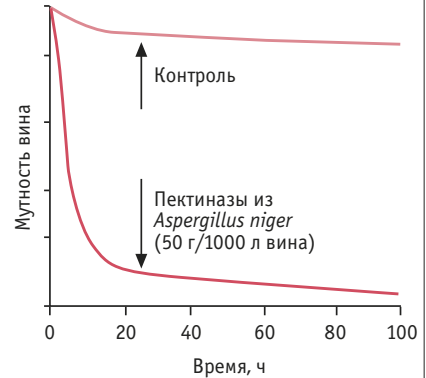
Добавление пектиназ, иногда с целлюлазами и гемицеллюлазами (30 мин, 30 °С), отжим, декантация, протирание

Соки с мякотью

Пастеризация или обработка пектиназами, фильтрация через мембраны



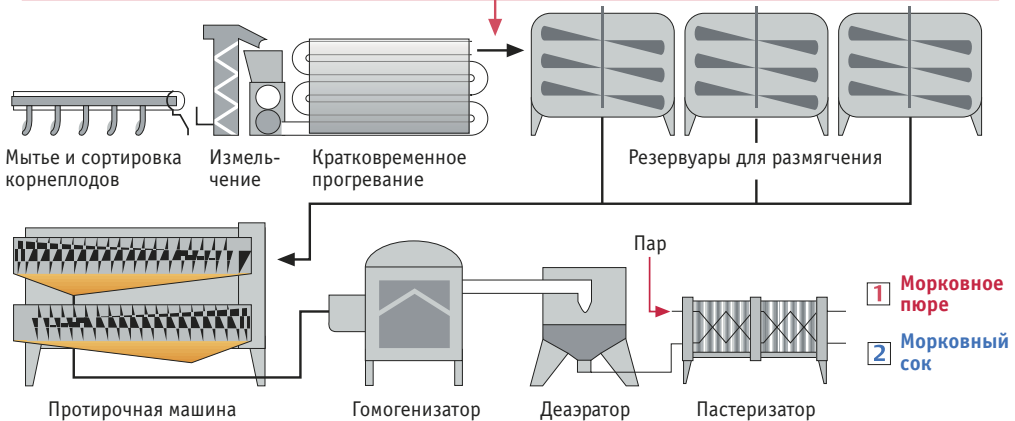
Пектиназы из *Aspergillus niger*



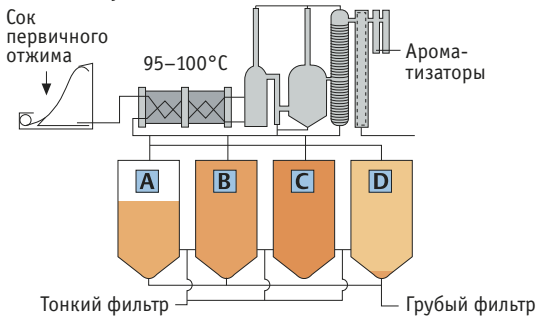
Переработка моркови

1 Пектиназы из *Aspergillus niger*

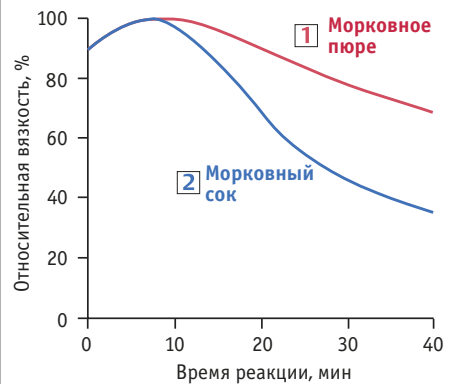
2 Пектиназы и С1-целлюлазы из *Aspergillus niger*



Концентрат яблочного сока



- A** + **B** Резервуары с ферментами: пектиназы и α-амилазы
- C** + **D** Резервуары для осветления сока: желатин, бентонит



Ферменты в производстве молочных продуктов

ВВЕДЕНИЕ. Наиболее важные ферменты, используемые при производстве молочных продуктов, относятся к протеазам, лактазам и липазам. 1. Самое большое промышленное значение имеют высокоспецифичные протеазы (сычужный фермент, реннин). Объем мирового производства этих ферментов составляет около 1000 т в год, с использованием этих ферментов производства ~13 млн т сыра (2004 г.). 2. Обработка липазами и протеазами придает сыру специфический аромат. 3. Процесс производства многих молочных продуктов включает расщепление молочного сахара. Эту реакцию осуществляет β -галактозидаза (лактаза). 4. Особый интерес вызывает использование молочной сыворотки – побочного продукта молочной промышленности. Сыворотка образуется в больших количествах (около 50 млн тонн в год), и ее утилизация обходится очень дорого. Однако сыворотка богата питательными веществами и может быть использована как питательная среда для роста микроорганизмов. 5. В некоторых развивающихся странах для стерилизации молочных продуктов применяют лизоцим или H_2O_2 /каталазу.

МОЛОКО. Молоко представляет собой эмульсию мелких капелек жира в водном растворе. Для молока характерен следующий химический состав: вода (90%), триглицерины (жиры) (2–4%), молочный сахар и белки (в сумме около 3%). Основным компонентом белковой фракции молока – сложные фосфопротеины с молекулярной массой 20–30 кДа семейства казеиногена, формирующие агрегаты размером до 1 млн Да. κ -Казеин в свежем молоке служит коллоидобразующим агентом. Для осаждения казеинов при приготовлении молочных продуктов используют различные методы: добавление ионов Ca^{2+} в концентрации более 6 мМ, закисление среды до pH < 4,6, гидролиз пептидной связи между $^{105}P_{ro}$ и ^{106}Met в молекуле κ -казеина. Последняя реакция осуществляется с помощью протеолитического фермента химозина (реннина), который вырабатывается в слизистой оболочке желудка.

ПРОТЕИНАЗЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ КАЗЕИН. В желудке млекопитающих казеин молока гидролизует под действием кислот и химозина. Использование химозина при приготовлении сыра или творога – один из самых старых способов консервирования продуктов. Согласно классическому методу, фермент выделяют из желудков (сычугов) молочных телят, однако полученные таким способом препараты часто загрязнены другими ферментами. Учитывая технологическую важность ферментов, расщепляющих казеин, особое значение приобретают методы получения бактериальных протеиназ и синтеза рекомбинантного химозина. Протеиназа из гриба *Mucor miehei* обладает

той же специфичностью, что и животный химозин, то есть расщепляет казеин в положении между $^{105}P_{ro}$ и ^{106}Met . Этот фермент широко применяется в промышленности и получил название «бактериальный сычужный фермент». В 1987 г. ген предшественника сычужного фермента теленка был клонирован в клетки *E. coli* как прохимозин, а с 1992 г. в США рекомбинантный фермент разрешен к применению в сыроварении. В странах ЕС и в Японии рекомбинантный химозин используется с 1997 г. В качестве хозяйских клеток в настоящее время предпочитают использовать *Kluyveromyces lactis*.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ЛАКТОЗЫ (МОЛОЧНОГО САХАРА).

Все детеныши млекопитающих, в том числе наши дети, получающие материнское молоко, способны усваивать лактозу. Однако после перехода на «взрослую» пищу многие особи теряют эту способность. Явление «непереносимости» лактозы встречается у людей почти всех народов. «Непереносимость» лактозы заключается в том, что сахар не усваивается в желудке, поэтому использование в пищу обычных молочных продуктов, богатых лактозой, вызывает диарею. Сходное по симптомам, однако обусловленное другими причинами редкое заболевание галактоземия возникает в результате рецессивного дефекта аутосомного гена. При галактоземии нарушается синтез УДФ-галактозы, поэтому в организме накапливается избыточное количество токсических продуктов метаболизма галактозы. Больные галактоземией не должны употреблять в пищу продукты, содержащие галактозу. Лактоза молочных продуктов при непереносимости к ней должна быть предварительно гидролизована до глюкозы и галактозы. Йогурты, лактозный сироп для хлебопечения и другие молочные продукты, не содержащие лактозу, получают путем ферментации с помощью рекомбинантных микроорганизмов.

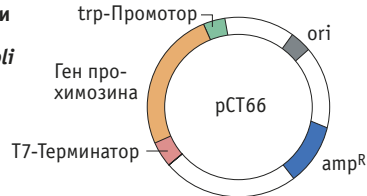
СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА-АРОМАТИЗАТОРЫ В СЫРОВАРЕНИИ.

При обработке липазами содержащиеся в молоке триглицерины, ацилированные остатками карбоновых кислот с короткой или средней углеводородной цепью, сыры получают специфический аромат. Выбирая липазы различной специфичности, можно получать сыры с разными вкусовыми качествами.

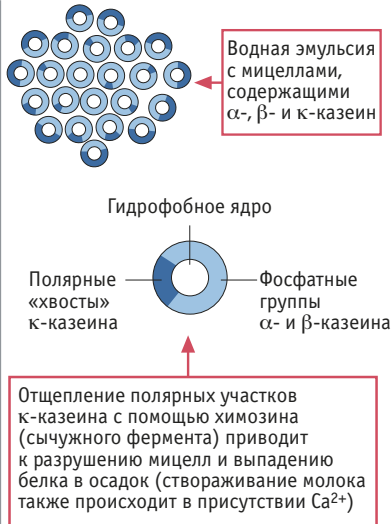
Состав молока

	Молоко, %	Сыворотка, %
Вода	~88	~94
Жиры	~3-4	~0,5
Белки	~3,3	~1
Казеины	~2,6	-
Лактоза	~3	~4,8

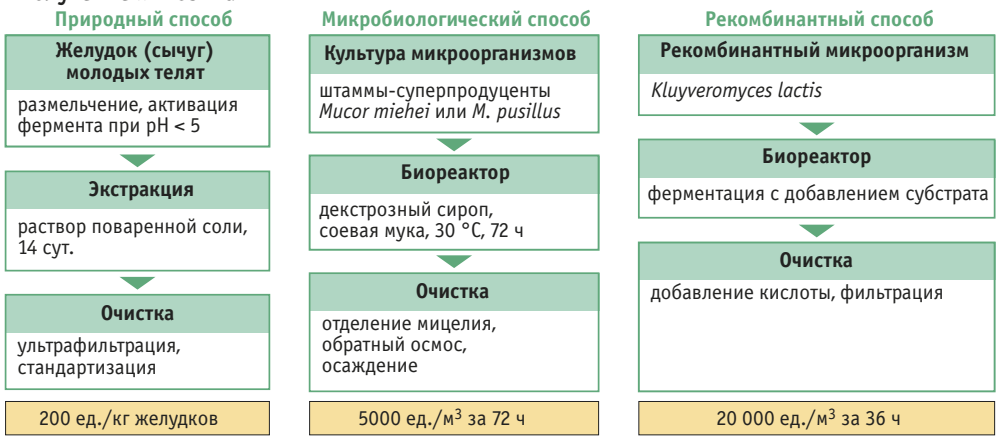
Плазмида для экспрессии прохимозина в клетках *E. coli*



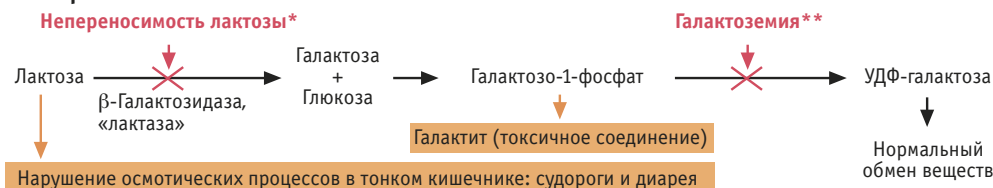
Переработка молока



Получение химозина



Непереносимость лактозы и галактоземия



** Более 70% взрослого населения южноафриканского народа банту, афроамериканцев, индейцев, китайцев и аборигенов Австралии

** Дефект гена 1-фосфат-уридилтрансферазы 9-й хромосомы, частота встречаемости 1:100 000

Использование ферментов в хлебобулочной и мясоперерабатывающей промышленности

ВВЕДЕНИЕ. Получение опары – наиболее важный этап в производстве хлебобулочных изделий. Комбинированное молочнокислое и дрожжевое брожение при изготовлении хлеба из ржаной муки способствует его лучшей усвояемости. Для приготовления теста, как правило, используют очищенные ферменты (α -амилазы, глюкоамилазы, протеиназы, ксиланазы). Специфические ксиланазы препятствуют образованию геля, вызванному пентозанами, и таким образом снижают вязкость ржаного или пшеничного теста. Роль амилаз, глюкоамилаз и протеиназ заключается в разрыхлении теста. В зависимости от природы муки для теста используют разные ферменты в разных соотношениях. Добавление β -амилазы, катализирующей образование мальтозы при гидролизе углеводов, позволяет значительно увеличить сроки хранения хлеба. Современная хлебопекарная промышленность во всем мире потребляет около 1000 тонн ферментов в год. Для производства колбасных изделий к мясу добавляют стартовые культуры микроорганизмов, что определяет вкусовые качества и сроки хранения полученных колбас. Нежный вкус мяса достигается обработкой протеиназами, которые частично расщепляют мышечные волокна. Чаще всего в мясной промышленности используют протеиназу папаин.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ХЛЕБА. Муку получают перемалыванием зерна. В зависимости от вида зерна различают пшеничную, ржаную муку, муку из спелты*. Свойства почвы, на которой выращивался злак, климат и уровень зрелости на момент сбора урожая определяют содержание крахмала, пентозанов и белков. Воздействие ферментов может изменять состав муки: так, амилазы расщепляют крахмал до декстринов (α -амилаза), мальтозы (β -амилаза) и в конце концов – до глюкозы. Этот процесс важен для следующих этапов переработки муки: например, пекарские дрожжи, используемые для приготовления опары, могут перерабатывать только моно- или дисахариды. Белок клейковины глютен связывает воду и формирует гелеобразную структуру теста. При действии протеиназ эту структуру можно частично разрушить и таким образом повысить эластичность теста: это необходимо для эффективного удерживания CO_2 , образовавшегося в результате жизнедеятельности дрожжей при получении опары. Слишком высокая концентрация протеиназ приводит к потере эластичности и излишнему размягчению структуры теста. На практике обычно используют α -амилазы, выделенные из солода, бацилл или плесневых грибов. Глюкоамилазы также получают из плесневых грибов. В со-

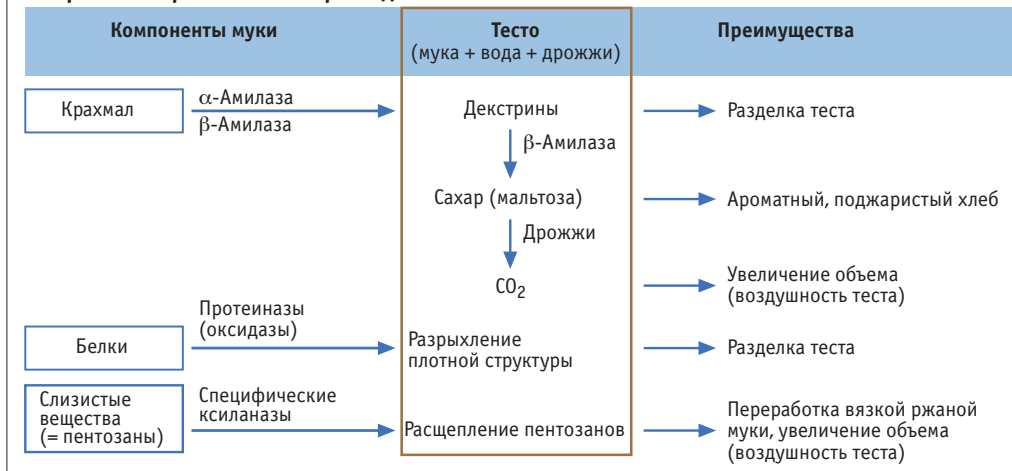
временном производстве используют дрожжи, которые оптимизированы для быстрого образования опары, следовательно и активность препаратов ферментов также должна быть высокой. Чаще всего применяется нейтральная протеиназа из *Aspergillus oryzae*, которая разрыхляет клейковину в необходимой мере, не приводя к излишнему расщеплению белка.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА. В современной хлебопекарной промышленности широко используются методы анализа и контроля технологических процессов. Например, для изучения газообразования и уменьшения вязкости используют метод определения числа падения. Для наблюдения за ходом протеолиза под действием протеиназ применяют фаринограф, экстенсограммы или альвеограммы, которые отражают изменение вязкости раствора при расщепления глютена.

ФЕРМЕНТЫ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ МЯСА. Мясо – это мышечная ткань, подвергнутая биохимической обработке. Особая роль в этой обработке принадлежит протеиназам (катепсинам). Основными критериями качества мяса служат сочность, вкусовые качества, цвет и мягкость. Существует множество способов сделать мясо более нежным на вкус: так, в Европе мясо маринуют, а в некоторых странах его заворачивают в листья папайи или замачивают в ананасовом соке или в соке папайи. При смачивании раствором папаина (сульфгидрильная протеиназа, выделенная из папайи) мясо тоже становится мягким. Можно также делать инъекции неактивного папаина животным непосредственно перед забоем: в мясе убитого животного окисленные группы папаина восстанавливаются, происходит активация фермента и частичное разрушение мышечной ткани.

* Спелта – зимостойкий сорт пшеницы, распространенный в Европе. – Прим. пер.

Ферменты, применяемые при подготовке теста

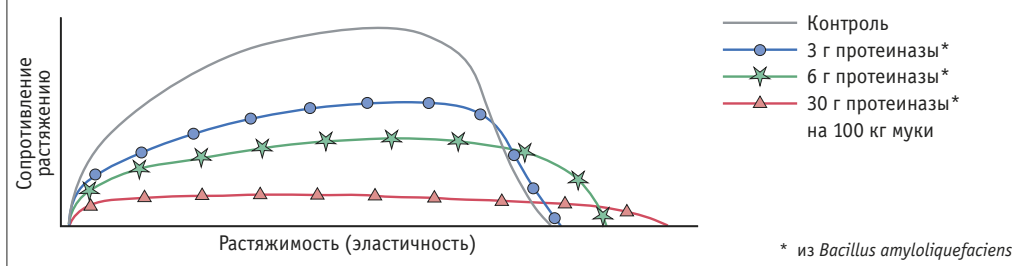


Ферменты в хлебопечении

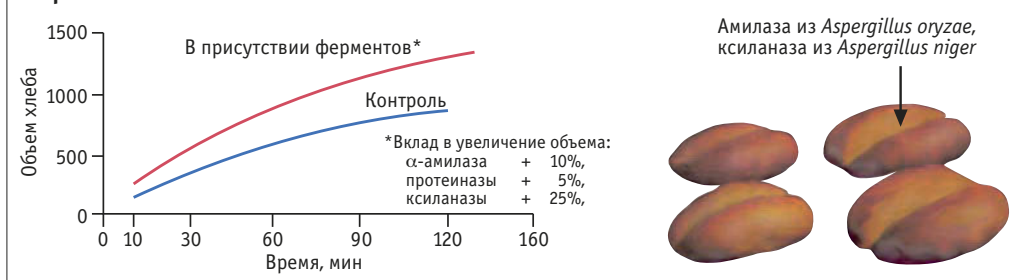
Фермент	Действие	Метод определения	Эффект
α -Амилаза из солода, <i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , глюкоамилаза из <i>Aspergillus oryzae</i>	Расщепление крахмальных гранул в муке, гидролиз крахмального клейстера с образованием мальтозы и глюкозы	Образование газа при дрожжевом брожении*, измерение вязкости (амилограф), пробная выпечка	Увеличение объема, улучшение структуры корочки, улучшение вкусовых качеств
Протеиназы из плесневых грибов	Разрушение глютена	Вязкость и эластичность (фаринограф, экстенсограммы и др.)	Эластичное тесто, повышенное содержание газа
Ксиланазы из <i>Trichoderma viride</i>	Разрушение слизистых веществ	Измерение вязкости (амилограф)	Улучшение механических свойств хлеба (пористость, равномерность)
β -Амилаза из <i>B. stearotheophilus</i> , <i>Aspergillus</i>	Увеличение срока хранения, более насыщенный аромат	Органолептически	Предотвращает взаимодействие крахмала и глютена

* *Saccharomyces cerevisiae* перерабатывают только мальтозу или глюкозу (не действуют на другие олигосахариды)

Эластичность теста



Пробная выпечка



Ферменты в кожевенной и текстильной промышленности

ВВЕДЕНИЕ. Ремесло выделки шкур животных было развито еще в античные времена. В этом процессе традиционно используется известь, концентрированные растворы щелочей, серосодержащие соединения, а по классическим (традиционным) методикам, экскременты домашних животных в качестве «ферментсодержащего» компонента. Отсюда сложившееся мнение о выделке кожи как о «грязном» производстве. В 1904 г. Отто Рём впервые подробно изучил процесс получения кожи из шкур животных, описал биохимические реакции каждой стадии и показал важность использования ферментов в этом производстве. Объем протеаз, потребляемых современными кожевными предприятиями, составляет около 100 т в год.

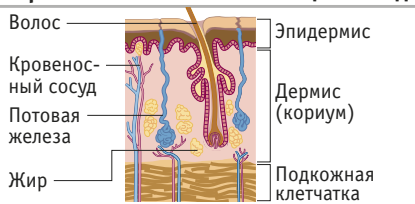
КОЖА млекопитающих имеет следующий состав: 60–65% воды, 30% белков и 2–10% жиров. Белки кожи в основном (на 90%) представлены коллагеном, а другие компоненты (кератин, эластин и др.) составляют всего 10%. *Эпидермисом* называется внешний слой кожи, это 1% толщины всего кожного покрова. В эпидермисе выделяют следующие зоны (начиная от внешней поверхности): роговая, блестящая, зернистая и ростковая (или мальпигиева). Расположенный под эпидермисом слой соединительной ткани называется *дермисом* (другие названия: кориум, кутис) – 85% толщины кожи. В дермисе располагаются корни волос, кровеносные сосуды, потовые и сальные железы. Поверхностная зона дермиса (сосочковая), богатая коллагеновыми волокнами и сосудами, имеет рыхлую структуру и выполняет питательную функцию, а ниже располагается ретикулярный слой из плотной соединительной ткани. Еще глубже находится подкожная клетчатка (15%), состоящая из соединительной ткани и жировых отложений («лицевой спилкок»). При выделке кожа освобождается от волос, мышечных компонентов, нефибриллярных белков и воды. Нестабилизированная (плохо выделанная) кожа во влажных условиях быстро разлагается под действием бактерий, а при высыхании становится ломкой.

ОБРАБОТКА КОЖИ ФЕРМЕНТАМИ. Свежие шкуры консервируют (солевание), чтобы предотвратить гниение в результате заражения микроорганизмами. После этого сухие шкуры можно хранить в течение продолжительного времени. Затем следует стадия отмоки, когда шкуру помещают в раствор, содержащий повехностно-активные и другие вещества для удаления грязи, крови, остатков жиров и нефибриллярных белков. Для ускорения и улучшения качества отмоки в современном кожевном производстве часто используют протеолитические ферменты. Сырье, предназначенное для изготовления дорогих сортов кожи, сохраняющих естественный рисунок, проходит обработку протеиназами, при которой происходит полное разрушение

пигментных включений, потовых и сальных желез. Такие сорта изготавливают с применением прозрачных анилиновых красителей и поэтому их называют анилиновыми. Применяемые ферменты должны проявлять высокую активность, однако при этом не разрушать коллаген. Наибольшее распространение получили трипсин (панкреатический экстракт) и другие протеиназы, выделенные из *Bacillus subtilis* и *Aspergillus sojae*. Следующая стадия – золение – заключается в обработке шкуры суспензией извести с добавлением сульфита натрия, в результате ослабляется связь между шерстью и дермисом. Раньше такую обработку осуществляли вручную втиранием суспензии в поверхность шкуры. В современной промышленности золение проводят с использованием сильнощелочных растворов гидроксида кальция, сульфита натрия, а также устойчивых в щелочных условиях протеиназ, например из *Bacillus alkalophilus*. Затем следует стадия мягчения, во время которой происходит обеззоливание с помощью солей аммония или органических кислот. Особая роль в мягчении принадлежит панкреатическим ферментам и нейтральным и щелочным протеазам, выделенным из бактерий и грибов. Эти ферменты удаляют остатки неколлагеновых белков и разрыхляют коллаген, делая его более доступным для окрашивания. Для хромового дубления также используют протеазы, выделенные из грибов. Попытки усовершенствовать технологический процесс и повысить эффективность процессов отмоки, золени и мягчения, объединив их в одном производственном этапе пока не увенчались успехом, однако в этом направлении ведутся активные работы. Уже предложены технологии, позволяющие на 50% снизить время обработки и количество используемой воды.

ШЛИХТОВАНИЕ ТЕКСТИЛЬНЫХ ИЗДЕЛИЙ. В ткацком производстве качество продукции и производительность в значительной мере зависят от прочности нити. Для того чтобы не допустить разрыва волокон при многократном растяжении, нити шлихтуют, то есть наносят на них тонкий слой клеящего вещества. Чаще всего в качестве шлихты используют крахмал. Перед окрашиванием и дальнейшей обработкой полученной ткани необходимо удалить шлихту. В случае крахмальной шлихты для этого используют α -амилазу, выделяемую обычно из *Bacillus sp.* α -Амилаза и целлюлаза используются также при производстве джинсовых («stone-wash») тканей (как правило, эти ткани приобретают особый внешний вид при стирке в присутствии камней и песка).

Строение кожи млекопитающих и выделка кожи



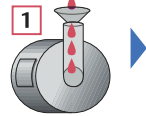
Солевание (консервирование)



Хранение сырой кожи



Отмока, зольение (освобождение от шерсти, разрыхление)



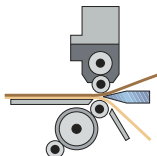
Мездрение (на этой стадии кожа называется «гольем»)



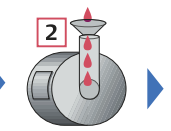
Горизонтальное разделение кожи при пропускании через специальные станки



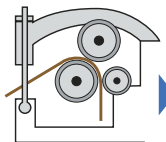
Двоение



Обеззоливание, мягчение, пикелевание, хромовое дубление



Отжим



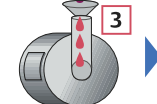
Фальцевальный нож



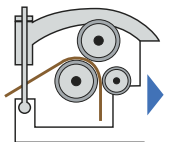
Этот полуфабрикат кожи называется вет-блю



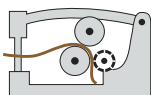
Нейтрализация, дубление, окрашивание, жиrowание



Подсушивание



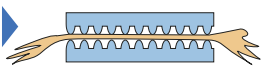
Вытягивание



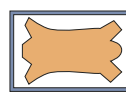
Высушивание



Кондиционирование



Правление кожи

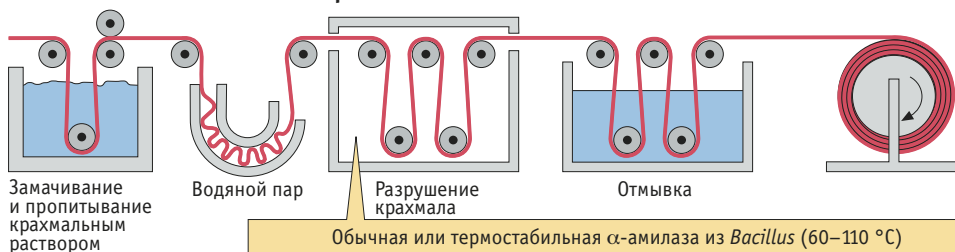


Кожа на этой стадии называется крастом

Ферменты в кожевном производстве

Этап отделки	pH	Объект воздействия	Фермент
1 Отмока (разрушение белков, клеточных включений, освобождение от шерсти)	7–9	Нефибрилярные белки, жиры	Протеиназы из грибов и бактерий, трипсин (панкреатический экстракт)
1 Обезволашивание	10	Кератин	Кератиназы, протеиназы
1 Зольение	12,5	Неколлагеновые белки	Протеиназы из грибов и бактерий (эластаза)
2 Обеззоливание и мягчение	8–9	Остатки белков, жировые клетки	Протеиназы из грибов и бактерий, трипсин (панкреатический экстракт)
2 Пикелевание, кислое мягчение (увеличение эластичности, улучшение впитывания красителя)	5–6	Коллаген	Протеиназы из грибов и бактерий, трипсин (панкреатический экстракт)
3 Разрыхление полуфабриката вет-блю	6	Кожа после хромового дубления	Протеиназы из грибов дубления

Шлихтование в текстильной промышленности



Перспективы получения ферментов для промышленных технологий

ВВЕДЕНИЕ. Стремительный прогресс генетической инженерии обусловил развитие новых подходов к поиску ферментов: усовершенствованы традиционные методы скрининга, разработаны методики переноса генетической информации между различными организмами и во многих случаях найдены пути увеличения выхода необходимого фермента. Несмотря на это, в промышленном синтезе ферменты все же редко выдерживают конкуренцию с химическим синтезом. Во-первых, для многих важнейших реакций синтеза, например, реакции образования углеродных связей, известно лишь несколько ферментов, не требующих дорогостоящих кофакторов. Во-вторых, время, которое затрачивается на разработку метода получения фермента и на повышение выхода продукта в штаммах-продуцентах, значительно превышает время на полный цикл внедрения метода химического синтеза веществ для фармакологии или сельского хозяйства. Ввиду явного отставания ферментативного синтеза от химического становится очевидной актуальность следующих направлений развития науки: 1) рациональная белковая инженерия; 2) направленная эволюция; 3) новые методы скрининга для изучения огромного разнообразия природных ферментов.

НОВЫЕ ИСТОЧНИКИ ФЕРМЕНТОВ. Живые организмы обитают в самых разнообразных условиях и вырабатывают ферменты, приспособленные для функционирования в специфических средах. Механизмы приспособления к условиям существования особенно разнообразны у микроорганизмов: в процессе эволюции некоторые из них сумели приспособиться к самым экстремальным условиям – pH, температура, жесткий осмос и др. При систематическом скрининге необычных сред обитания (щелочные или кислые природные среды, глубоководные впадины, горячие источники и др.) регулярно обнаруживают новые микроорганизмы, из которых выделяют ферменты с необычными свойствами. Так, ДНК-полимераза I (*Taq*-полимераза), широко применяемая для проведения ПЦР, выделена из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, обитающей в гейзере (90 °С) на территории Йеллоустонского заповедника. В гидротермальных источниках (110 °С, 150 бар) Средиземного моря на глубине 1500 м были обнаружены не изученные ранее микроорганизмы, относящиеся к группе архей. Оказалось, что ДНК-полимераза этих организмов делает меньше ошибок, чем *Taq*-полимераза в аналогичных условиях. Некоторые из этих ферментов уже поступили в продажу, в частности *Pfu*- и *Tma*-полимеразы.

НОВЫЕ МЕТОДЫ СКРИНИНГА. Современные методы молекулярной биологии, в частности белковая инженерия или направленная эволюция, открывают новые возможности для скрининга и оптимизации фермен-

тов для промышленного применения. Наиболее наглядны успехи направленной эволюции для получения ферментов, обладающих высокой стабильностью в экстремальных температурных и кислотно-щелочных условиях. Методами биоинформатики можно проводить ускоренный поиск новых ферментов на основе данных, полученных при секвенировании геномов. К настоящему времени полностью секвенированы геномы нескольких сотен микроорганизмов: при сравнении их последовательностей с консенсусными последовательностями известных ферментов удалось обнаружить несколько сотен ферментов с неясной субстратной специфичностью. С помощью ПЦР были получены кДНК этих ферментов, однако поиск природных субстратов – чрезвычайно сложная задача. Анализ консенсусных областей 16S-rРНК различных бактерий позволил предположить, что к настоящему времени лишь 1% всех существующих бактерий классифицированы и могут быть культивированы. В связи с этим осуществляются попытки обнаружения новых ферментов из некультивируемых микроорганизмов путем выделения и экспрессии ДНК («Метагеном») из естественных природных источников. Для этого выделяют ДНК, при помощи ферментов расщепляют ее на фрагменты небольшого размера, чтобы их можно было встроить в вектор, затем экспрессируют их в клетках-хозяевах и проводят функциональный анализ полученных продуктов. Несмотря на то что методика еще не окончательно разработана, таким способом уже удалось выделить и охарактеризовать несколько ферментов с необычными функциями.

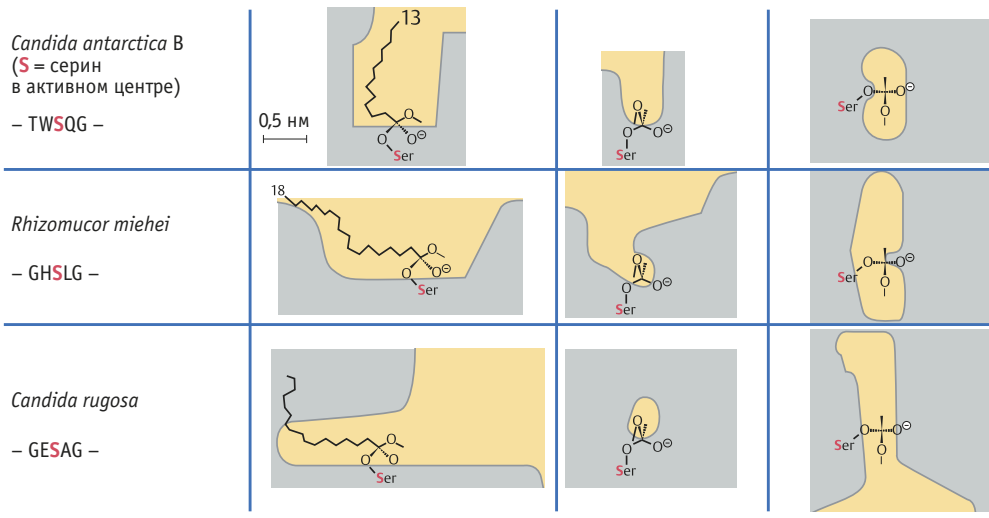
Разнообразие живых организмов (число видов)



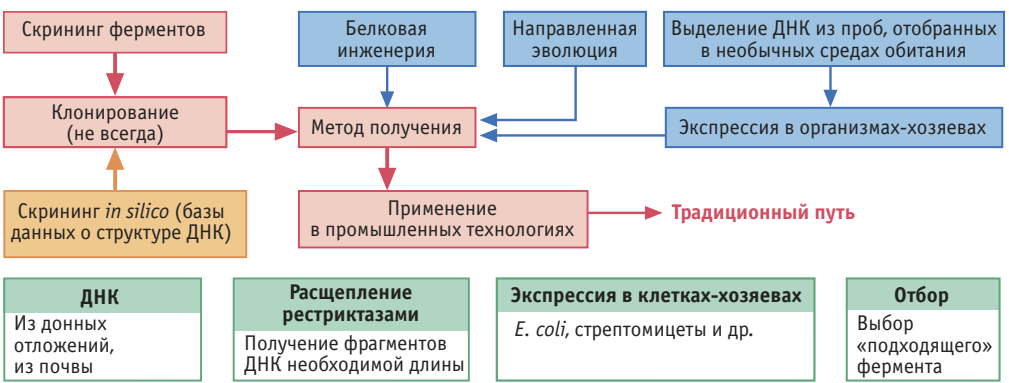
Свойства различных ДНК-полимераз

Источник	Время полужизни фермента при 95° С, мин	3' → 5'-экзонуклеазная активность	5' → 3'-экзонуклеазная активность	Свойства концевых участков продукта
<i>Thermus aquaticus</i>	40	Отсутствует	Присутствует	3'A
<i>Thermotoga maritima</i>	20	Отсутствует	Присутствует	3'A
<i>Pyrococcus furiosus</i>	> 120	Присутствует	Отсутствует	?
<i>Thermococcus litoralis</i>	1380	Присутствует	Отсутствует	> 95% тупых концов

Разнообразие липаз (структура и консенсусная последовательность)



Способы получения новых ферментов



Белковая инженерия

ВВЕДЕНИЕ. Под термином *белковый дизайн* или *белковая инженерия* принято понимать замену аминокислоты (аминокислот) в белке методами генетической инженерии. Такие изменения проводят с целью: 1) изучения механизма ферментативной реакции; 2) изменения субстратной или антигенной специфичности белка; 3) создания белка с новыми свойствами (температурная и pH-стабильность, устойчивость к действию протеиназ, растворимость, аллергенные свойства). Для этого в белке с известной аминокислотной последовательностью осуществляют направленную замену определенной аминокислоты. Такой подход называется рациональным дизайном. Отбор среди множества белков, полученных в результате случайного мутагенеза, тех, которые обладают определенными свойствами, называется направленной эволюцией.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ. Оба метода — рациональный дизайн и направленная эволюция — предполагают внесение мутаций в ген исследуемого белка и последующую экспрессию мутантных форм. Информацию о том, какую аминокислоту следует изменить, в случае белковой инженерии получают из структуры белка (например, рентгеноструктурного анализа кристалла белка или ЯМР-исследования) или структурных моделей, полученных методами биоинформатики из сравнения с гомологичными белками с известной пространственной структурой.

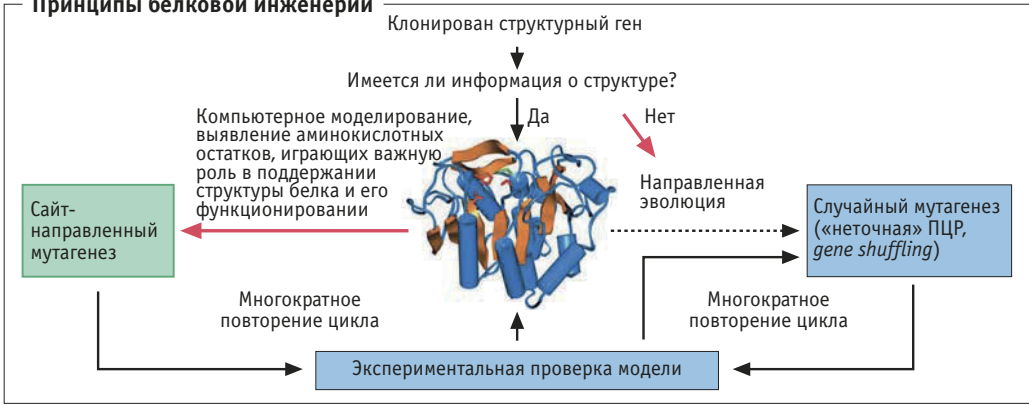
МУТАГЕНЕЗ. В современных исследованиях с целью делеции определенной аминокислоты или ее замены используется метод ПЦР. Разработаны многочисленные методики, позволяющие достаточно быстро и воспроизводимо осуществлять модификации белка. Для проведения случайного мутагенеза ген в составе вектора вносят в клетки штамма *E. coli*, в котором нарушена система репарации ДНК, и затем культивируют клетки в условиях, вызывающих мутации. Другой способ введения случайных мутаций заключается в изменении условий реакции ПЦР (например, добавление ионов Mn^{2+}), приводящих к увеличению вероятности ошибок при амплификации ДНК до 1–3%. Метод *gene shuffling* основан на том, что гомологичный ген (>80% идентичных оснований) ферментативным путем расщепляют на небольшие фрагменты, а затем мутации вносятся в ходе ПЦР как результат случайной (статистической) рекомбинации.

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН. Информацию о пространственной структуре белка получают из данных рентгеноструктурного или ЯМР-анализа. К середине 2005 г. данные о пространственной структуре почти 30 000 белков были размещены в базе данных (Protein DataBase, PDB). Когда таких данных нет, то используют компьютерные банки данных: если имеется

белок с известной структурой, более чем на 30% гомологичный исследуемому, можно предсказать структуру исследуемого белка (*молекулярное моделирование*). Еще недавно подобное моделирование было доступно лишь в виде приближенных расчетов для условий вакуума. С использованием современных суперкомпьютеров и расчетных систем становится возможным предсказание структуры белка, особенностей его взаимодействия с субстратом или антигенами в водном растворе. Расчеты молекулярных механизмов зачастую требуют обработки данных о десятках тысяч атомов одновременно. Данные, полученные с применением такой «*in silico*»-методики, всегда должны контролироваться в ходе многократных циклов моделирования и в генноинженерных экспериментах («цикл белковой инженерии»).

НАПРАВЛЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ. В отличие от рационального белкового дизайна для осуществления направленной эволюции не нужно знать структуру белка. В ген исследуемого белка (фермента) случайным образом вносят мутации, а затем с помощью быстрого функционального теста из образовавшихся форм белка выбирают те, которые обладают улучшенными свойствами, например повышенной активностью. Метод *phage display* позволяет быстро анализировать способность большого количества мутантных белков (10^{10}) связываться с другими веществами, прежде всего с антителами. В обоих случаях решающую роль играет качество чипов. В последнее время методы направленной эволюции позволили достичь значительных успехов в оптимизации ферментов, используемых в промышленности. Стало возможным менять субстратную специфичность белков, их термостабильность и устойчивость в спиртовых растворах. Для скрининга большого количества мутантов разработаны автоматические многоканальные системы.

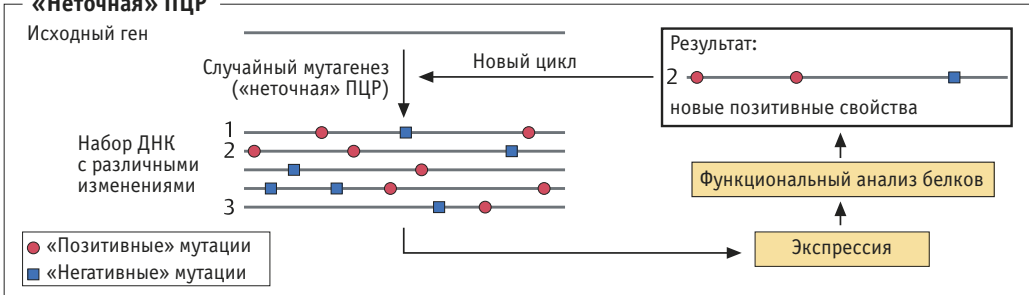
Принципы белковой инженерии



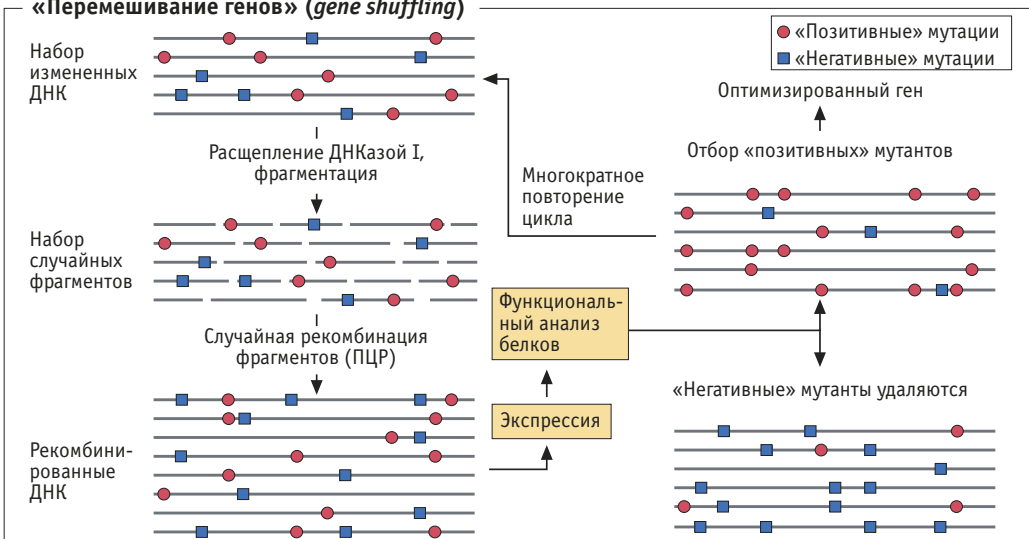
Примеры

Фермент	Метод	Мутация	Эффект
Протеаза, используемая в стиральном порошке	Рациональный дизайн	222Met → Ala	Устойчивость к окислению
Инсулин человека	Рациональный дизайн	22Lys → Pro	Замедленная деградация
Тканевой активатор плазминогена	Рациональный дизайн	4 положения + замена углеводного остатка	Замедленная деградация
Пенициллиназа	Направленная эволюция	5 положения	Повышенная устойчивость
P450-гидроксилаза жирных кислот	Направленная эволюция	4 положения	Изменена субстратная специфичность

«Неточная» ПЦР



«Перемешивание генов» (*gene shuffling*)



Пекарские и кормовые дрожжи

ВВЕДЕНИЕ. Технология приготовления теста из муки известна с древних времен. На древнеегипетских глиняных табличках изображен процесс выпечки «пивного» хлеба из ячменных зерен при дрожжевом брожении. До XIX в. в Европе для хлебопечения также использовали пивные дрожжи, которые получали по «голландскому» способу (1750 г.) фильтрацией солодового отстоя или по «венской» технологии (1800 г.) – соскабливанием со стенок бродильного чана. В 1870 г. Луи Пастер показал, что рост биомассы пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* происходит в аэробных условиях. С этого времени культивирование пекарских дрожжей осуществляется в открытых резервуарах с интенсивным перемешиванием и аэрацией. Основным источником углерода служит меласса. Мелкими хозяйствами в некоторых странах в 30-е гг. XX в. были предприняты первые попытки получения кормовых дрожжей. В послевоенные годы их применение оказалось наиболее актуальным в развивающихся странах, где имелся недостаток белковых продуктов.

СЫРЬЕ ДЛЯ ФЕРМЕНТАЦИИ. Чаще всего сырьем для ферментации служит меласса (отходы производства сахара из сахарной свеклы или сахарного тростника). Это объясняется низкой стоимостью мелассы, а также высоким содержанием в ней легко расщепляемых азотсодержащих соединений, витаминов и микроэлементов. Мелассу эстрагируют горячей водой из измельченной массы сахарной свеклы или тростника. Меласса содержит 40–50% сахарозы, которая под действием инвертазы из *Saccharomyces cerevisiae* превращается в глюкозу и фруктозу.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС. Для того чтобы коэффициент превращения мелассы в биомассу дрожжей Y_s был максимален, необходимо насколько возможно снизить скорость образования этанола; для этого культивирование проводят при интенсивной аэрации и тщательно регулируют содержание глюкозы в питательной среде. При содержании глюкозы > 100 мг/л происходит ингибирование катаболитами, и начинается анаэробное брожение, сопровождающееся образованием этанола. Современные установки для культивирования дрожжей обладают системой контроля за поступлением мелассы и устройствами для перемешивания. Эффективность процесса превращения мелассы в биомассу дрожжей описывают параметром H_{27} – это относительная величина, равная 27% массы сухих дрожжей в мелассе. Меласса содержит 50% сахара, а максимальный выход дрожжей составляет 54 г на 100 г израсходованного сахара, таким образом, из 1 кг мелассы можно получить 1 единицу H_{27} (т. е. 270 г дрожжей из 1 кг мелас-

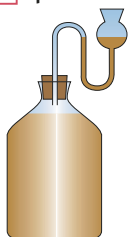
сы). В результате высушивания прессованных дрожжей в мягких условиях получают сухие дрожжи, которые могут храниться несколько месяцев, а при добавлении воды и сахара начинают работать уже через несколько минут.

КОРМОВЫЕ ДРОЖЖИ. По рыночной цене и пищевой ценности для сельскохозяйственных животных кормовые дрожжи составляют конкуренцию таким источникам белка, как рыбная или соевая мука. Решающим фактором, влияющим на цену кормовых дрожжей, является доступность источника углерода, необходимого для осуществления ферментации. В настоящее время изучаются возможности выращивания дрожжей на отходах нефтяной и газовой промышленности, этаноле, метаноле, целлюлозе, крахмале, молочной сыворотке и других доступных источниках углерода. Шведский метод Симба, основанный на использовании картофельного крахмала (с участием дрожжей *Endomycopsis fibuliger* и *Candida utilis*; при этом первый вид расщепляет крахмал, а второй синтезирует клеточный белок); финский метод Пекило, в котором гриб *Paecilomyces variotii* синтезирует клеточный белок из углеводных остатков от производства целлюлозы, а также канадский метод Ватерлоо, в основе которого выращивание гриба *Chaetomium cellulolyticum* на побочных продуктах сельского хозяйства, лесозаготовок и лесопереработки (солома, багасса*, стойловой навоз, древесные опилки) – все эти технологии нашли широкое применение из-за высоких цен на соевую муку, но впоследствии в связи с удешевлением растительного белка они потеряли свою конкурентоспособность. Сейчас применяется только метод МакДугалла, разработанный фирмой Rank-Novis, в котором средой для роста гриба *Fusarium graminearum* служит очищенная глюкоза. Quorn™, клеточная масса этого гриба, ценится как фирменное вегетарианское блюдо с хорошим вкусом и необычной текстурой, поэтому данный метод успешно реализуется во многих странах.

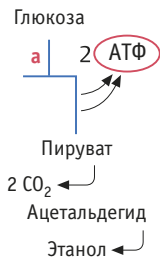
* Багасса – жом сахарного тростника. – Прим. пер.

Пекарские дрожжи

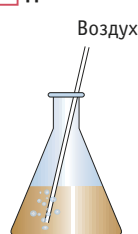
А Брожение



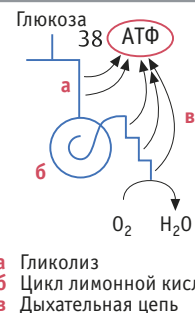
Анаэробный процесс



Б Дыхание



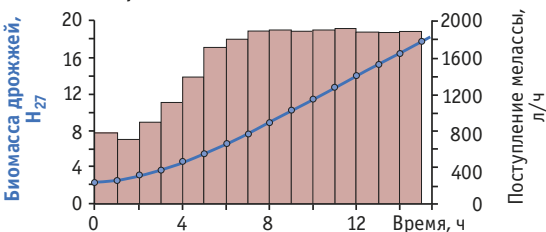
Интенсивная аэрация



Метод	Количество полученной биомассы H ₂₇ *, кг	Этанол, л
А «Голландский» (до 1850 г.)	3–6	25–30
«Венский» (до 1915 г.)	14	25
«Копенгагенский» (с 1877 г.)	20	20
Б Современные технологии	до 85	< 1

* Современные технологии позволяют получать до 27 кг сухого веса дрожжей (H₂₇) из 100 кг мелассы

Культивирование дрожжей в системе с автоматизированной подачей мелассы



Предферментация

Инокулят штамма

Биореактор

Рабочий объем более 100 м³, меласса, источники азота

Выделение

Сепаратор

Побочные продукты

Этанол, сточные воды, барда

Товарные дрожжи H₂₇

Вакуумный вращающийся барабанный фильтр

Сухие пекарские дрожжи

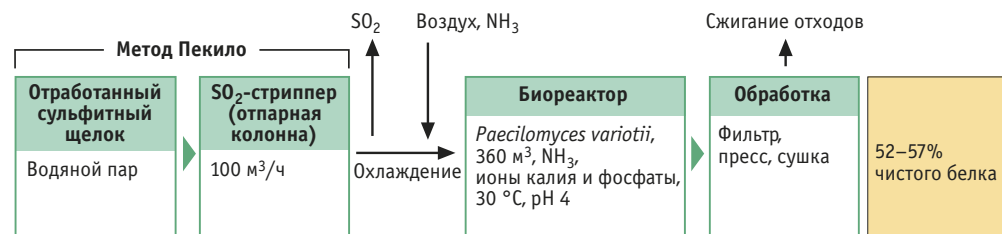
Экструзия, высушивание в псевдо-ожиженном слое, охлаждение

Кормовые дрожжи

Пастеризация

Кормовые дрожжи

Сырье	Дрожжи и грибы	Примечания
Картофельный крахмал	<i>Endomycopsis fibuliger</i> <i>Candida utilis</i>	Метод Симба (Швеция), <i>E. fibuliger</i> гидролизует крахмал, <i>Candida utilis</i> растет быстрее и при росте на глюкозе формирует биомассу
Молочная сыворотка	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	При очистке сточных вод в молочной промышленности. Продукт содержит дрожжи и остаточные количества молочной сыворотки
Отработанный сульфитный щелок	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Paecilomyces variotii</i>	Остатки гексоз перерабатываются <i>S. cerevisiae</i> , пентоз – <i>C. utilis</i> , метод Пекило (Финляндия); ферментация в непрерывном режиме для получения кормовых дрожжей из отработанного сульфитного щелока
Очищенная глюкоза	<i>Fusarium graminearum</i>	Метод Rank-Hovis McDougall (Великобритания); использование волокнистой структуры мицелия в качестве «функционального белка»



Уровень переработки биodeградируемых веществ в молоке достигает 85%

Белки и жиры из одноклеточных организмов

ВВЕДЕНИЕ. В мире существует недостаток белковой пищи из-за роста населения Земли. Развитие технологии ферментации и возможность использования отходов нефтяной промышленности для выращивания микроорганизмов в 1960-е гг. привели к разработкам крупномасштабного культивирования микроорганизмов в качестве источника белка для питания человека и животных (белок одноклеточных организмов – 600). Технология получения жиров из одноклеточных организмов разрабатывалась в Германии во время Второй мировой войны, когда основные импортеры растительных жиров – Азия и Америка – прекратили свои поставки.

БЕЛКИ ИЗ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ: СЫРЬЕ И МИКРООРГАНИЗМЫ. Между 1965 и 1975 гг., когда цены на нефть были не столь велики, проекты по использованию нефтяных фракций в качестве источника углерода для роста дрожжей *Candida tropicalis*, *C. bombicola* и др. вызвали повышенный интерес. Полное окисление алканов и их β -окисление в цикле трикарбонных кислот происходит в пероксисомах дрожжевых клеток. С 1972 г. действуют процессы ферментации метанола с помощью различных метилотрофных микроорганизмов: *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Candida boidinii*, *Methylophilus methylotrophus*, *Methylomonas clara*. Образующиеся в результате окисления метанола муравьиная кислота и формальдегид поступают в пентозофосфатный цикл.

ПЕРЕРАБОТКА АЛКАНОВ ДРОЖЖАМИ. Высококипящие фракции нефти малорастворимы в воде, а добавление эмульгаторов в среду ферментации нежелательно из-за усиления пенообразования и загрязнения конечного продукта. Таким образом, необходимо решить проблему перемешивания системы: интенсивная аэрация (16 моль-эквивалентов кислорода на 1 моль-эквивалент гексадекана, интенсивность пропускания воздуха – 10 объемов на объем ферментера в минуту) не должна приводить к избыточному пенообразованию. Первые крупные фабрики «Бритиш петролеум» в Сарроке (Сардиния) и Грэнджмаусе (Шотландия) были снабжены ферментерами с мешалками и пеноотделителями; ферментеры на этих производствах имели рабочие объемы 100 м³ и 40 м³ соответственно. При ферментации в непрерывном режиме за 5 сут. из 1 кг нефти было получено 0,9 кг клеточной массы дрожжей *Candida tropicalis*. По окончании ферментации клетки дрожжей отделяли в сепараторах. Токсический эффект от высокого содержания РНК (4%) уменьшают путем осторожного аутолиза. Дрожжи сушат в кипящем слое, получая твердый продукт в виде песчинок.

ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ МЕТАНОЛА ДРОЖЖАМИ.

Низкокипящий метанол ($T_{\text{кип}} 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) в концентрации более 100 мг/л токсичен даже для метилотрофных организмов. В сконструированных в Биллингеме (фирма ICI) ферментерах (8 × 60 м) метанол впрыскивают в реактор через 600 отверстий, в результате удается оптимизировать распределение метанола по объему биореактора, а также скорость его растворения в среде. Высокая эффективность аэрации достигается пропусканием реакционной смеси через трубку в виде петли. С помощью бактерии *Methylophilus methylotrophus* в непрерывном режиме за 2 сут. было получено 0,5 кг биомассы (PRUTEENTM) из 1 кг метанола. После ферментации клетки отделяют с помощью сепаратора. После удаления примесей РНК аутолизом белковый продукт высушивают распылением (в кипящем слое) и получают готовый к продаже продукт.

ОБЩЕСТВЕННОЕ МНЕНИЕ И ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ.

Перспектива использования продуктов переработки алканов в пищу вызвала активную критику из-за опасности попадания в пищевые продукты канцерогенов полиароматической природы из нефти. Несмотря на клинические и токсикологические исследования, в 1974 г. было получено разрешение на использование продуктов переработки метанола в качестве кормовых добавок для скота. После повышения цен на нефть реализация этого проекта была приостановлена. Поступление на рынок метанол-перерабатывающих дрожжей, предназначенных для производства кормовых добавок, почти не встретило возражений. Однако в связи с подорожанием метанола в странах ЕС для производства комбикормов предпочитают использовать сухое снятое молоко.

ЖИРЫ ИЗ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ получают из глюкозы с помощью дрожжей *Rhodotorula glutinis* или грибов *Mortierella isabellina*. Содержание жира превышает 60% сухого веса клетки. Состав триглицеридов значительно отличается от всех известных к настоящему времени растительных липидов, поэтому на рынке этот продукт не имеет себе равных.

Белок из одноклеточных организмов

Источник углерода	Микроорганизм	Проблемы
Парафин	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida tropicalis</i>	Сложности переработки (эмульсия), вкус, присутствие компонентов нефти, возражения общественности
Метан	<i>Methylococcus capsulatus</i>	Высокий расход кислорода, сильно экзотермическая реакция (необходимо охлаждение), опасность взрыва
Метанол	<i>Hansenula polymorpha</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Candida boidinii</i> , <i>Methylophilus methylotrophus</i>	Высокое содержание РНК

Состав соевой муки и сухого молока по сравнению с белком из одноклеточных организмов

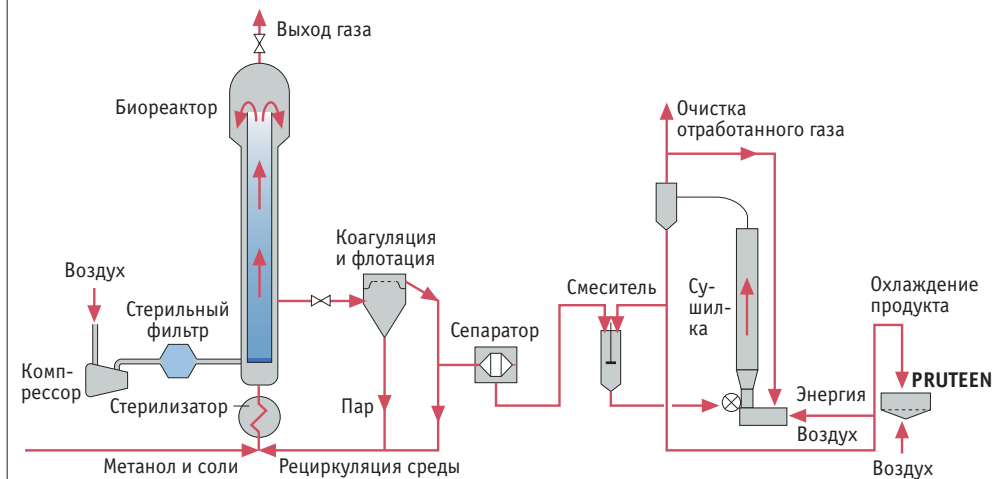
Белковый продукт	Сырой белок	Аминокислоты	Жиры	Нуклеиновые кислоты	Соли, вода
TOPRINA	60	54	9	5	10
PRUTEEN	83	65	7,4	15	10
Соевая мука	45	40	2	–	18
Сухое молоко	34	–	1	–	13

Выход белков из одноклеточных организмов (пилотные и промышленные установки)

Микроорганизм	Источник углерода, обмен веществ	Y_s^*	Продуктивность, кг/(м ³ · час)
<i>Candida lipolytica</i> (TOPRINA)	Алканы	0,95	2
<i>Methylophilus methylotrophus</i> (PRUTEEN)	Метанол, РМФ	0,53	8–10
<i>Candida utilis</i>	Этанол	0,8	4,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (пекарские дрожжи)	Меласса, ФДФ	0,85	5,2
<i>Paecilomyces variotii</i> (PEKILO)	Сульфитный щелок, ФДФ	0,6	2,7

* г сухого вещества/г источника углерода РМФ: Рибулозомонофосфатный путь; ФДФ: Фруктозодифосфатный путь

Производство белкового продукта PRUTEEN



Производство PRUTEEN

Сырье Метанол (впрыскивают через 600 отверстий), NH ₃ , соли	Эрлифтный реактор Рабочий объем 3000 м ³ , высота 60 м, вес 600 т	Коагуляция и флотация 30 мин при 64 °С, содержание РНК уменьшается с 80 до 2 мг/г	Выделение Сепараторы, высушивание	83% сырого белка, менее 1% нуклеиновых кислот
---	--	---	---	---

Аэробная очистка сточных вод

ВВЕДЕНИЕ. Внедрение около 100 лет тому назад системы очистки сточных вод (капельных фильтров и методов с использованием активного ила) наряду с появлением канализации в значительной мере препятствовало распространению эпидемий и, следовательно, привело к увеличению средней продолжительности жизни человека. Сегодня в развитых странах сточные воды в основном очищаются биологическими методами. В Германии в эксплуатацию введены около 10 000 очистных сооружений, из которых подавляющее большинство (96%) используют активный ил. Промышленные предприятия, расположенные по берегам Рейна, потребляют, а затем очищают около 15 млрд м³ воды в год. Проблема очистки сточных вод особенно остро стоит в странах, имеющих выход к морю: к сожалению, до сих пор определенное количество неочищенных стоков попадает в моря. В развивающихся странах, где индустриализация происходит на фоне быстрого прироста населения, проблема очистки питьевой воды очень актуальна и требует принятия незамедлительных мер.

ХАРАКТЕРИСТИКИ СТОЧНЫХ ВОД. Выделяют два вида сточных вод – бытовые и промышленные. Состав промышленных сточных вод определяется их происхождением, а бытовые сточные воды в значительной мере имеют постоянный состав. Наиболее распространенным критерием оценки степени загрязнения бытовых сточных вод является показатель биохимического потребления кислорода (БПК₅), равный количеству растворенного кислорода, поглощаемого единицей объема сточных вод в течение 5 сут при температуре 20 °С. Среднее значение органического загрязнения бытовых сточных вод составляет около 60 г БПК₅ в расчете на одного человека в сутки. Одно из самых опасных последствий сброса сточных вод – уменьшение количества растворенного кислорода в тех водоемах, куда сбрасываются отходы: это приводит к гибели аэробных микроорганизмов и бурному развитию различных анаэробных организмов, в том числе и патогенных. Показателем снижения концентрации кислорода в водоеме, куда сбрасываются бытовые сточные воды, служит химическое потребление кислорода (ХПК), отражающее концентрацию веществ, подверженных химическому окислению, и общее содержание углерода (ОСУ) в единице объема сточных вод. Часто промышленные и бытовые стоки очищаются совместно.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА. В основе очистки вод в биологическом реакторе с аэрацией лежит активность микроорганизмов, водорослей и простейших, обитающих в активном иле. Состав популяций организмов для очистки бытовых стоков остается постоянным в течение продолжительного времени и может значительно изменяться при попадании в стоки промышленных отходов. Наиболее точные данные о составе популяции можно сделать на основе анализа 16S-rPHK методом FISH.

В настоящее время разрабатываются стартовые культуры, которые остаются жизнеспособными в составе смешанной культуры и эффективно осуществляют деградацию некоторых химических отходов.

КАПЕЛЬНЫЙ (ПЕРКОЦИОННЫЙ) БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФИЛЬТР. После того как сточные воды освобождены от крупных частиц, они поступают в биологический капельный фильтр, в котором микроорганизмы распределены по поверхности рыхлого материала (например, окаменевшей лавы). В капельном фильтре кислород поступает к микроорганизмам в результате естественной диффузии (конвекции), и именно скорость этого процесса определяет эффективность деградации отходов. Скорость поступления сточных вод должна быть достаточно низкой, чтобы жидкость не препятствовала дыханию аэробных микроорганизмов. Как правило, сточные воды накапливаются в специальных резервуарах и подаются на фильтр путем разбрызгивания.

ОЧИСТКА С УЧАСТИЕМ АКТИВНОГО ИЛА. При создании современных очистных сооружений, как правило, используют аэробные реакторы – аэротенки. Снабжение микроорганизмов активного ила кислородом происходит при пропускании воздуха через реактор (барботирование воздуха). Активный ил обладает высокой адсорбционной способностью: частички, содержащие микроорганизмы, присоединяются к суспендированным в стоке твердым веществам и осуществляют их окисление, а затем частицы ила оседают на дно. По сравнению с капельным биологическим фильтром очистка с участием активного ила более эффективна (примерно в 5 раз) и может быть усовершенствована путем пропускания чистого кислорода вместо воздуха. Недостаток использования активного ила – большие площади очистных сооружений и, следовательно, ограниченные возможности регуляции процесса. В Германии принята трехступенчатая система очистки сточных вод, которая включает биологическую или химическую деградацию фосфатов, биологическую нитрификацию (превращение азотсодержащих органических соединений в аммиак, а затем в нитриты и нитраты) и денитрификацию (превращение нитрата в N₂ и N₂O).

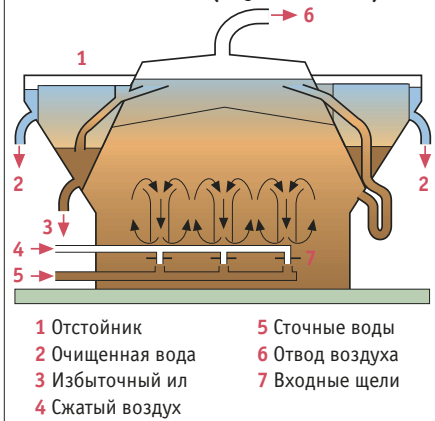
БАШЕННЫЕ ОЧИСТИТЕЛИ. Крупные химические производства Bayer и Hoechst снабжены дополнительными системами очистки сточных вод – башенными очистителями. Это закрытые 30-метровые реакторы, в которых благодаря интенсивной аэрации и тщательно регулируемой скорости поступления стоков происходит эффективная очистка промышленных стоков. Такая очистка экономически выгодна. Кроме того, закрытые системы препятствуют распространению неприятного запаха, характерного для процесса очистки стоков. Для повышения эффективности деградации вредных веществ в систему добавляют бытовые сточные воды.

Состав сточных вод

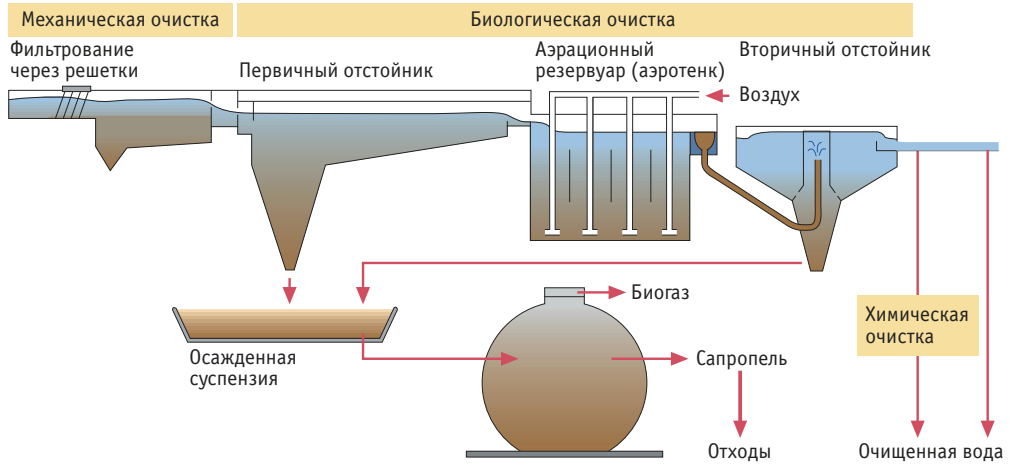
Источник	Содержание органических веществ, ед*	Примечания
Бытовые сточные воды	1	На одного жителя
Пивоваренные предприятия	150–350	На 1000 л пива
Молочная промышленность (без производства сыра)	25–70	На 1000 л молока
Крахмальный завод	500–900	На 1000 т кукурузы
Производство шерсти	200–4500	На 1 т шерсти
Целлюлозно-бумажная промышленность	200–900	На 1 т бумаги
Сахарозавод	1000–2000	На 1 т сахара

* Единица, соответствующая 60 г БПК₅ в расчете на одного человека

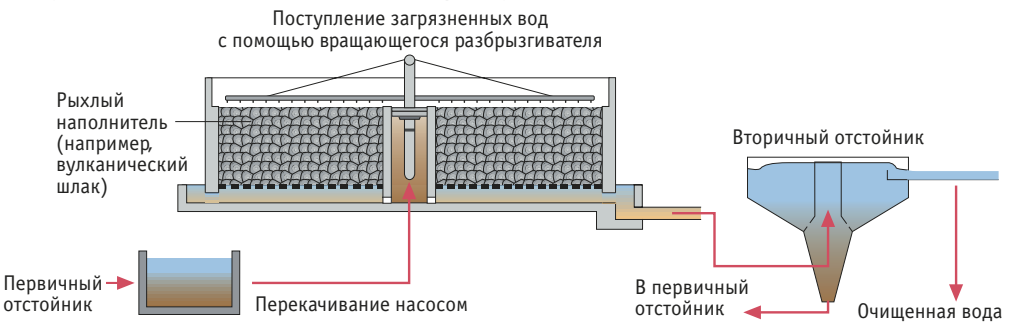
Башенное очистное сооружение с активным илом (Bayer, Hoechst)



Устройство биологического очистного сооружения



Устройство капельного биологического фильтра



Технические характеристики очистных систем

	Капельный фильтр	Активный ил	Башенный очиститель
Высота, м	2–4	3–6	30
Диаметр, м	до 30	до 30	30
Рабочий объем, м ³	~ 10	~ 100	15 000
Время пребывания сточной воды в реакторе, ч	~ 4	6–10	14
Снижение БПК ₅ , т/сут	0,5	2	100

Анаэробная очистка сточных вод и переработка ила

ВВЕДЕНИЕ. Активный ил, содержащий большое количество биологических продуктов, подвергается очистке в анаэробных условиях, а затем сжигается или используется в сельском хозяйстве. Сбраживание сточных вод – важный процесс: в Германии в эксплуатацию введены более 5000 метантенков (аппаратов для анаэробной преработки ила) с общим рабочим объемом 1 млн м³. За год в этих аппаратах образуется 100 млн м³ биогаза. В реакторах с неподвижным слоем также возможна анаэробная переработка сточных вод: такой способ имеет очень важное значение при очистке промышленных стоков, содержащих биологические загрязнения, в частности отходы пищевой промышленности. В странах со средним уровнем развития экономики анаэробная переработка отходов – важный источник биогаза.

МИКРООРГАНИЗМЫ. В процессе метанообразования при переработке ила принимают участие различные бактерии: 1) облигатные или факультативные анаэробы (клостридии, стрептококки, энтеробактерии), которые из крахмала, жиров и белков синтезируют органические кислоты, H₂ и CO₂; 2) уксуснокислые бактерии, превращающие органические кислоты в ацетат, H₂ и CO₂; 3) метанообразующие микроорганизмы, продуцирующие CO₂ и метан из уксусной кислоты. Метанообразующие микроорганизмы являются облигатными анаэробами и в большинстве своем относятся к археям.

ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА. Важнейшие характеристики процесса анаэробной переработки ила – химическое потребление кислорода (ХПК) и интенсивность образования биогаза. ХПК – количество кислорода, необходимое для полного химического окисления пробы (в данном случае ила) до H₂O и CO₂. На практике для вычисления ХПК проводят окисление пробы с помощью бихромата. Уменьшение показателя ХПК определяет степень минерализации пробы. Биогаз – это продукт естественного анаэробного процесса, происходящего в Земле. Природный газ на две трети состоит из метана и на треть – из CO₂. В нем также содержатся небольшие количества H₂, N₂, H₂S и других газов. Точный состав биогаза можно определить методом газовой хроматографии.

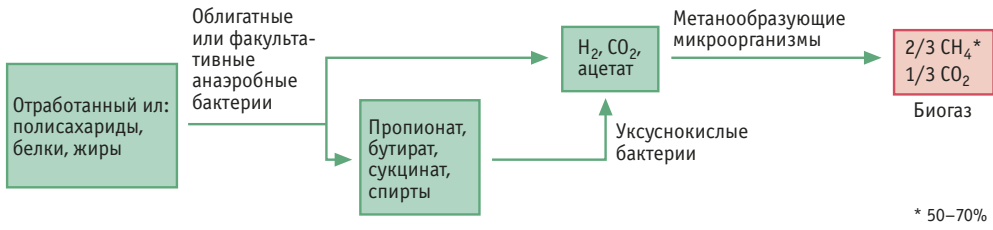
ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ. По сравнению с аэробной очисткой сточных вод очистка в анаэробных условиях происходит значительно медленнее (время пребывания ила в метантенке – более 20 сут. Смешанная культура микроорганизмов, необходимых для полноценной переработки ила, развивается в узком диапазоне температур и значений pH, поэтому в течение всего длительного процесса необходим тщательный контроль этих параметров. Преимущества процесса – отсутствие неприятного запаха, характерного для аэробной технологии, а также практически

полная переработка (более 90%) органических субстратов в метан и CO₂ при сравнительно небольшой эффективности образования биомассы. Ил после переработки захоранивается, сжигается или используется в качестве удобрения в сельском хозяйстве. Образующийся при анаэробной очистке ила метан применяется в качестве топлива для энергоснабжения очистных станций, для выработки тепла и электроэнергии.

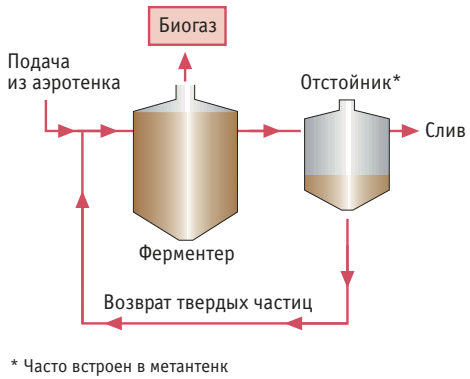
АНАЭРОБНЫЙ РЕАКТОР С НЕПОДВИЖНЫМ СЛОЕМ ИЛА. Сточные воды, загрязненные органическими соединениями, могут быть подвергнуты анаэробной очистке без предварительной обработки в аэробных условиях. В колонном реакторе бактерии эффективно прикрепляются к частицам ила силами химико-биологического сродства или поверхностного натяжения при добавлении ПАВ или совместно с частицами ила сорбируются на носителях. В результате оседания частиц в нижней части реактора образуется зона повышенной плотности. Загрязненные воды поступают в реактор снизу вверх, а образующийся в процессе окисления биогаз обеспечивает перемешивание реакционной среды. В верхней части реактора расположен газоуловитель, в котором частицы, сорбировавшиеся на поверхности пузырьков газа отделяются, а затем вновь поступают в реакционную смесь. Во многих случаях, например при обработке сточных вод сахарного, целлюлозно-бумажного и крахмального производств, в результате анаэробной обработки ХПК снижается на 95%. При этом процесс характеризуется интенсивным синтезом CO₂.

БИОГАЗ. По приблизительным оценкам, в Китае и Индии в настоящее время введены в эксплуатацию около 100 000 метантенков. В соответствии с законами о возобновляемых источниках установки, использующие биогаз, появляются также в Германии. Сбраживание богатого крахмалом растительного сырья (например, кукурузы) позволит удовлетворить энергетическую потребность 3 млн домов.

Схема анаэробной очистки воды



Метантенк



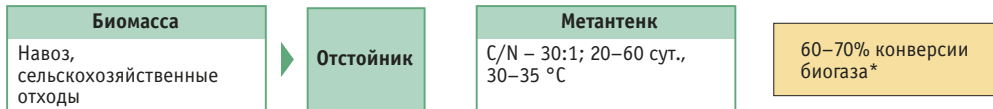
Анаэробный реактор с неподвижным слоем ила



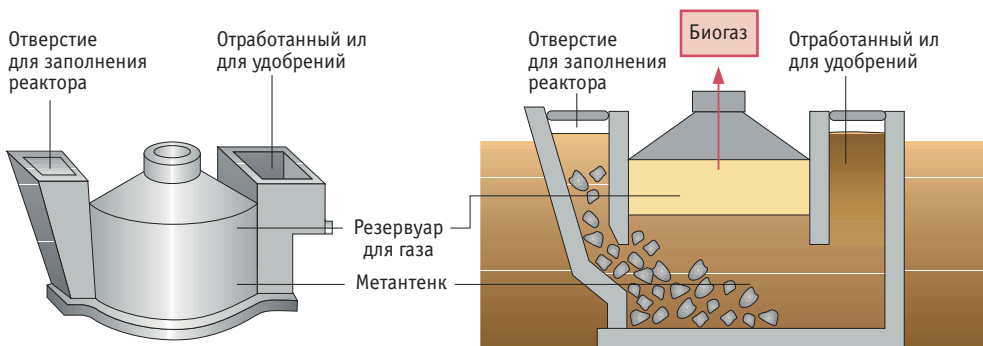
Технические характеристики

	Метантенк	Контактная обработка	Анаэробный реактор с неподвижным слоем
Высота, объем	до 30 м, 50000 м ³		до 20 м, 2000 м ³
Загрузка, кг ХПК/(м ³ · сут.)	1–8	1–5	5–30
Время пребывания загрязненных вод, сут.	10–30	0,5–25	0,2–1,5
Время пребывания микроорганизмов, сут.	10–30	> 20	> 100
Степень очистки, % ХПК	30–70	60–90	80–90

Производство биогаза в сельском хозяйстве



* 2–5 м³ биогаза/сут. в расчете на содержание сельскохозяйственных животных массой 1 т. Энергетическая ценность этого биогаза эквивалентна 1–3 л дизельного топлива



Биологическая очистка газовых выбросов

ВВЕДЕНИЕ. Значительное ужесточение контроля состава отработанных и выхлопных газов за последние десятилетия привело к созданию биологических систем очистки воздуха. В основе процесса очистки лежит способность микроорганизмов переводить газообразные вещества в водорастворимую форму. В биофильтрах происходит деградация веществ, плохо растворимых в воде, а растворимые соединения разрушаются в капельных биофильтрах.

ОТРАБОТАННЫЙ ВОЗДУХ И ВЫХЛОПНЫЕ ГАЗЫ.

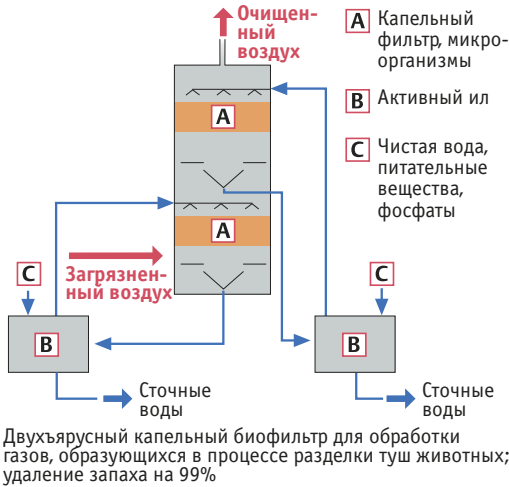
В последние десятилетия опыт использования биофильтров для избавления от неприятного запаха вблизи очистных сооружений нашел широкое применение. Биологическая очистка возможна и для отработанных газов литейных производств, предприятий пищевой промышленности, крупных животноводческих ферм и боен. Неприятный запах отработанного воздуха обусловлен наличием жирных кислот, аминов и меркаптанов (в случае свиноводческих ферм и боен), фенолов и низкомолекулярных аминов, альдегидов и кетонов (литейные производства), ароматических веществ (лакокрасочные производства) и фурфурала (предприятия пищевой промышленности). В последнее время биофильтры стали использовать и при очистке почв.

БИОФИЛЬТР. Конструкция биофильтра, как правило, простая. В качестве носителя используются компост, кора, торф, лава, шлак или другие материалы с развитой поверхностью. Иногда в материал-носитель вносят неорганические добавки для увеличения пористости. При пропуске отработанного воздуха через биофильтр находящиеся на поверхности носителя микроорганизмы окисляют загрязняющие вещества. После нескольких лет эксплуатации происходит разложение органического материала носителя, в результате чего эффективность очистки значительно снижается. Заполнение биофильтра новым носителем полностью восстанавливает прежние технические показатели. В зависимости от формы биофильтры подразделяют на плоские и многоярусные.

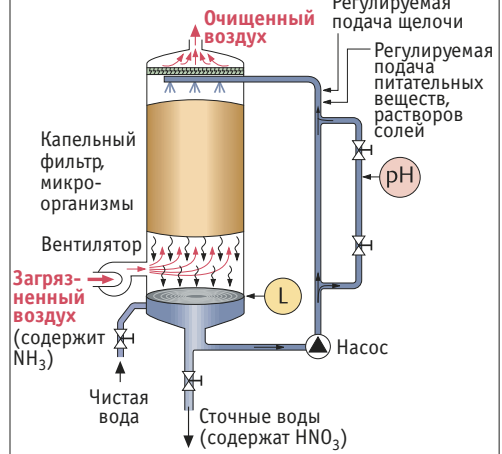
КАПЕЛЬНЫЕ БИОФИЛЬТРЫ устроены сложнее, чем биофильтры: на первом этапе загрязняющие вещества переводятся в растворимую форму и в таком виде смешиваются с питательной средой. Затем смесь поступает в резервуар, где происходит микробиологическая деградация загрязняющих веществ. Две стадии процесса очистки требуют специального оснащения. Очистка воздуха на капельных фильтрах происходит с большей эффективностью, чем в случае биофильтров, так как токсичные соединения выводятся из реактора вместе с водой. При очистке воздуха, загрязненного сероводородом, в биофильтрах быстро развиваются бактерии *Thiobacillus*, окисляющие H_2S до H_2SO_4 , что приводит к закислению среды, измене-

нию состава культуры микроорганизмов, а также повреждению оборудования. В конструкции капельных биофильтров предусмотрены способы контроля и регуляции параметров процесса, в том числе нейтрализация среды путем добавления щелочи. Это обеспечивает значительно более длительный срок эксплуатации капельных биофильтров по сравнению с биофильтрами. Время, необходимое для очистки воздуха от легкоразлагающихся веществ, например спиртов, составляет всего 1–2 мин. Если в воздухе содержатся трудноразлагаемые соединения, используют двухъярусный капельный фильтр или систему, включающую биофильтр и капельный фильтр. Например, очистка отходящих газов производства лакокрасочных изделий включает в себя две стадии: на первой стадии удаляются хорошо растворимые в воде и легко разлагаемые вещества (алифатические спирты и эфиры), а затем воздух очищают от таких более трудноудаляемых соединений, как ксилол и толуол. При очистке воздуха на животноводческих фермах удаляются CO_2 и неприятно пахнущие вещества, прежде всего аммиак. В капельных фильтрах, содержащих культуры нитрифицирующих бактерий, происходит превращение аммиака в нитрат. Образовавшаяся азотная кислота нейтрализуется, а выделяющееся тепло отводится с помощью теплообменников. Использование таких конструкций позволяет снизить выбросы аммиака с 5,3–5,7 кг до 0,2 кг в расчете на одно животное.

Двухъярусный капельный биофильтр

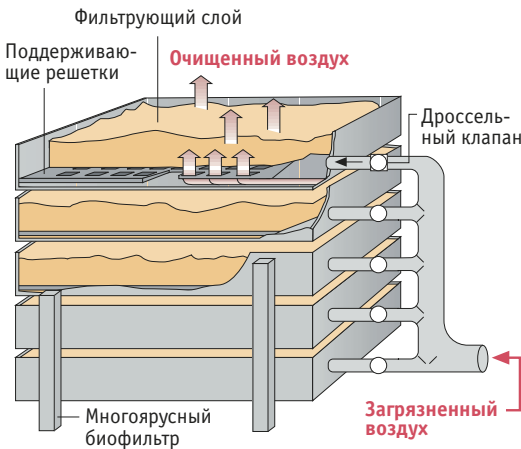


Капельный фильтр для очистки воздуха на животноводческих фермах



Биофильтр

Многоярусный биофильтр

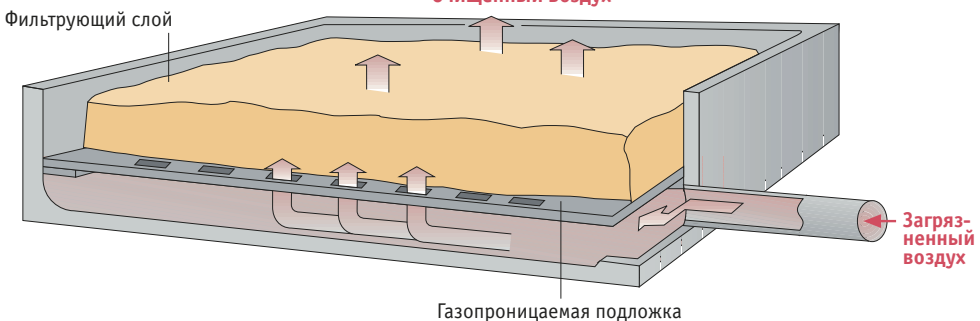


Фильтрующий слой:
компост, кора, лава, шлак,
волокнистый торф, керамзит

Вещества, определяющие запах загрязненного воздуха

Источник	Основные компоненты	Метод очистки
Животноводство	Низшие жирные кислоты, аммиак	Биофильтр
Промышленные отходы	Фенол	Биофильтр с <i>Pseudomonas</i>
Литейное производство	Фенол, формальдегид, амины, кетоны, альдегиды	Капельный фильтр
Бойни	Низшие жирные кислоты	Капельный фильтр
Химические заводы	Толуол, аммиак, альдегиды	Биофильтр или капельный фильтр
Метантенки	H ₂ S	Капельный фильтр

Плоский биофильтр



Биологическая очистка почв

ВВЕДЕНИЕ. Смешанные культуры микроорганизмов, которые осуществляют деградацию биомассы и превращают органические вещества в неорганические (процесс минерализации), играют важнейшую роль в круговороте химических элементов в природе. Использование микроорганизмов для очистки сточных вод уже давно стало рутинной процедурой, но для очистки почв микроорганизмы впервые стали применяться всего 20 лет назад. Существуют и другие способы оздоровления почвы – химический и термический. Для биологической очистки почв используют как природные, так и генетически измененные микроорганизмы. Очистку проводят *in situ* или после выемки.

ЗАГРЯЗНЕНИЕ И СТРУКТУРА ПОЧВЫ. Основными антропогенными веществами, загрязняющими почву, являются углеводороды минеральных масел (УММ), бензол, толуол, ксилол и этилбензол (БТКЭ), ароматические углеводороды (АУВ), хлорсодержащие углеводороды (ХУВ) и тринитротолуол (ТНТ) (в местах прохождения военных учений). В отличие от АУВ и ХУВ, УММ и БТКЭ достаточно легко подвергаются биологической деградации. Возможность биологической деградации веществ, загрязняющих почву, определяется многими факторами, в частности их растворимостью, а также структурой самой почвы: рыхлые почвы, содержащие высокий процент песка, очистить значительно легче, чем глиноземы. В настоящее время единственным способом очистки почвы от ТНТ является последовательная анаэробная и аэробная обработка.

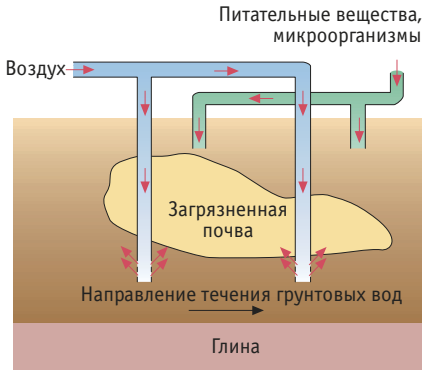
ОЧИЩЕНИЕ ПОЧВ *IN SITU*. После того как в почве пробурена скважина, туда помещают смешанную культуру микроорганизмов, способных разрушать загрязняющее вещество, а также загружают питательные вещества. Грунтовые воды разносят микроорганизмы на большие расстояния от скважины. В глинистых или суглинистых почвах аэрация значительно затруднена, поэтому там в качестве электронного акцептора выступает нитрат, а не молекулярный кислород. Повышение содержания нитратов в грунтовых водах приводит к нарушению естественного экологического баланса.

ОЧИЩЕНИЕ ПОЧВ *EX SITU*. Для очистки почв от загрязнений, хорошо поддающихся биологической деградации, верхний слой почв с определенного участка собирают и размещают в специальные шатровые хранилища в виде грядок высотой около 2 м. Затем в почву вносят микроорганизмы, эффективно перерабатывающие загрязняющие вещества, и питательные вещества. При интенсивной аэрации и правильно подобранной смешанной популяции микроорганизмов через две недели степень разложения загрязняющих веществ достигает 90%. Стоимость такой очистки почвы – от 75 до 150 евро/м³.

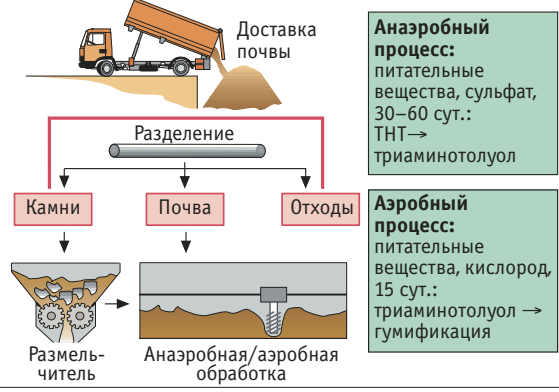
ГУМИФИКАЦИЯ ТНТ. Такие ксенобиотики, как три-, тетрахлоралкены и ТНТ весьма трудно поддаются аэробной биологической деградации, поскольку эти вещества несут большое количество отрицательно заряженных групп. Обработка таких веществ осуществляется с помощью анаэробных микроорганизмов. Для биологической очистки почв, загрязненных ТНТ, разработан двустадийный процесс: на первом этапе в 25-тонном реакторе проводят ферментацию с использованием сахарозы в качестве донора электронов. Через 18 сут в результате деятельности анаэробных микроорганизмов ТНТ практически полностью восстанавливается до триаминотолуола, который на втором этапе очистки в аэробных условиях необратимо связывается с компонентами почв, в особенности с гуминовыми веществами.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ. Современные биотехнологические методы позволяют получать рекомбинантные микроорганизмы, в которых сочетаются реакции обмена веществ разных организмов. Такие штаммы могут более эффективно перерабатывать конкретные загрязняющие вещества, чем дикие штаммы. Так получены штаммы для деградации хлор-ароматических, монохлордифензофурановых и алифатических углеводородов. Широкое применение находят псевдомонады, играющие важную роль в деградации алифатических и ароматических углеводородов в природе. Часть генетической информации, необходимой для осуществления реакций деградации, передается в виде TOL-плазмиды. Из соображений экологической безопасности генетически модифицированные микроорганизмы запрещено использовать на открытой местности, также продолжаются общественные дискуссии о допустимости использования генетически модифицированных растений.

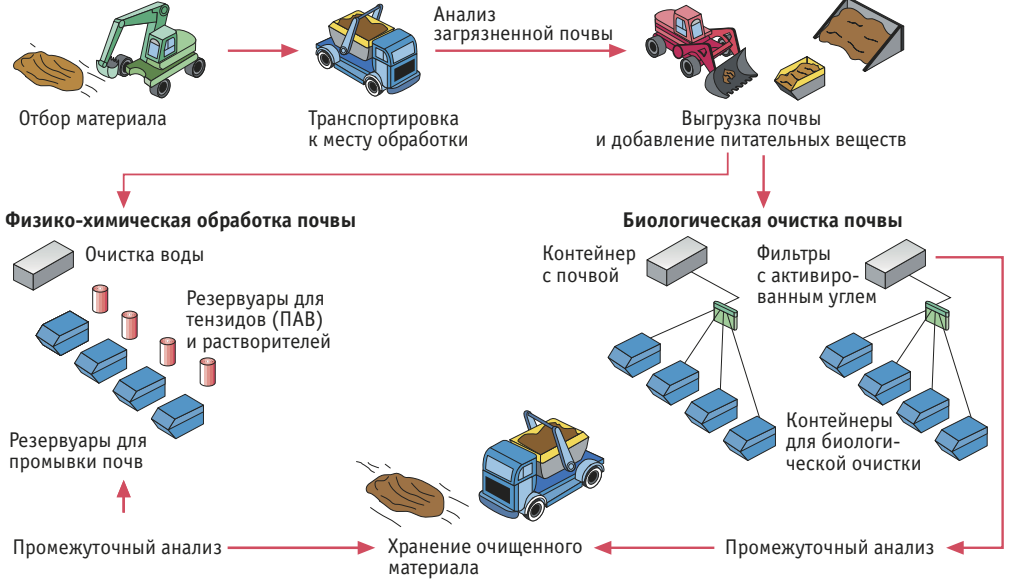
Биологическая очистка почв *in situ*



Анаэробно-аэробная переработка ТНТ

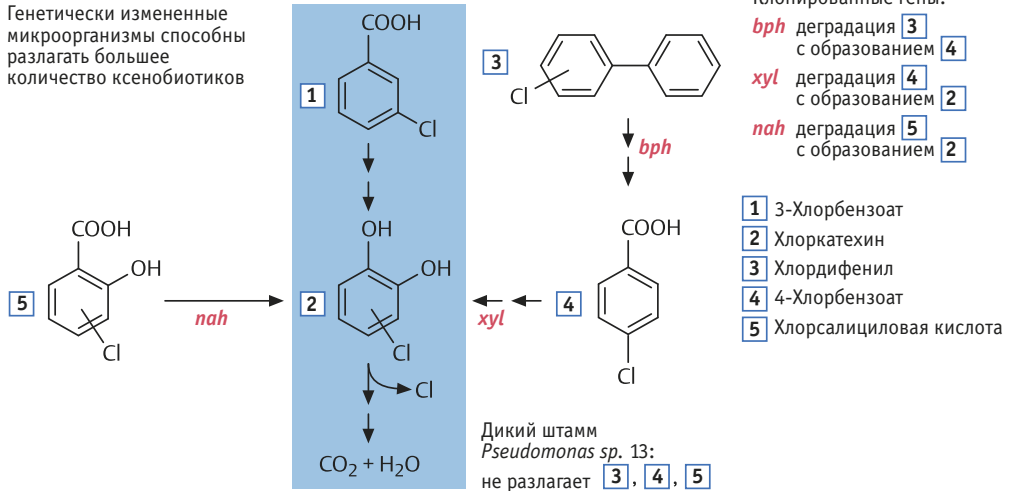


Биологическая очистка почв *ex situ*



Усовершенствование путей биodeградации

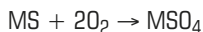
Генетически измененные микроорганизмы способны разлагать большее количество ксенобиотиков



Микробиологическое выщелачивание руд и биокоррозия

ВВЕДЕНИЕ. В США, Канаде, Австралии и Мексике для выщелачивания бедных руд (то есть для извлечения отдельных составляющих руды путем их растворения) используются тиобактерии. Около 25% всего мирового объема меди, более 10% золота и 3% кобальта и никеля добываются с помощью биовыщелачивания.

МИКРОБИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ ПРОЦЕССА. Тиобактерии осуществляют выщелачивание руд; эти хемолитотрофные грамотрицательные палочки, как правило, фиксируют CO_2 . Для получения энергии эти микроорганизмы окисляют восстановленные соединения серы, например сульфиды, в результате чего образуется серная кислота. В отличие от *Thiobacillus thiooxidans* бактерии *T. ferrooxidans* способны окислять не только восстановленные соединения серы, но и растворимые соли Fe^{2+} . Оба вида бактерий растут в кислой среде и устойчивы при pH 2. Сульфидные и оксидные компоненты руды, такие как пирит (серный или железный колчедан, FeS_2), халькозин (CuS_2), ковеллин (медный блеск, CuS), сфалерит (цинковая обманка, ZnS), галенит (свинцовый блеск, PbS), молибденит (молибденовый блеск, MoS_2), антимонит (сурьмяный блеск, Sb_2S_3), сульфид кобальта (CoS) и уранинит (UO_2) могут выщелачиваться посредством тиобактерий. При *прямом микробиологическом выщелачивании* происходит непосредственный контакт между бактериями и сульфид-содержащим минералом. Окисление до сульфата происходит в несколько стадий согласно следующему суммарному уравнению:



Непрямое бактериальное выщелачивание заключается в химическом превращении сульфидсодержащих минералов в растворимые сульфаты и свободную серу:



Образующееся двухвалентное железо Fe^{2+} окисляется бактериями до Fe^{3+} и снова может участвовать в окислительном процессе в кислых условиях. При pH 2–3 микробное окисление Fe^{2+} происходит в 10^5 – 10^6 раз эффективнее, чем химическое окисление. На практике два описанных способа выщелачивания руд часто проводят одновременно, так как руды имеют сложный состав.

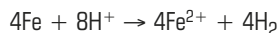
ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ. Для процесса выщелачивания руд оптимальны следующие условия: руда подходящего состава с требуемым размером частиц, проведение реакций в кислых условиях и при температуре около 30 °C, интенсивная аэрация. На практике выщелачивание руды проводят *in situ* непосредственно на рудном отвале или в специально от-

веденных местах, куда руда транспортируется. В другом способе используют отработанные шахты. Хорошо разработан метод чанового бактериального выщелачивания. Его преимущество по сравнению с другими способами заключается в высокой эффективности извлечения ценных металлов и экологической безопасности процесса. Изучается также метод выщелачивания гетеротрофными микроорганизмами. В основе метода лежит секреция активных хелатирующих веществ (таких, как лимонная или глюконовая кислоты), например штаммами пеницилла, которым для роста требуются органические источники углерода.

БИОКОРРОЗИЯ. В круговороте веществ в природе один из важных процессов – анаэробное окисление металлического железа с образованием FeS (биокоррозия). Реакцию



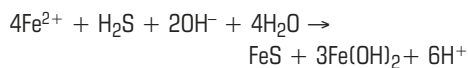
осуществляют анаэробные микроорганизмы, способные восстанавливать сульфат, например *Desulfovibrio vulgaris*. В анаэробных условиях железо также окисляется до Fe^{2+} :



Образующаяся в этом процессе водородная пленка защищает железо от дальнейшего разрушения. В присутствии сульфата *Desulfovibrio* окисляет H_2 :

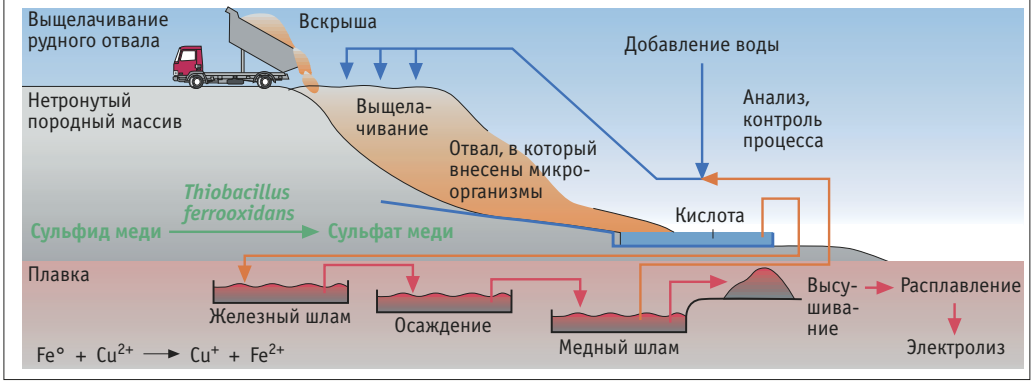


что приводит к образованию нерастворимых сульфидов железа и гидроксида железа:

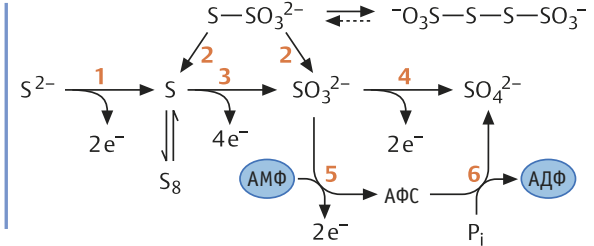
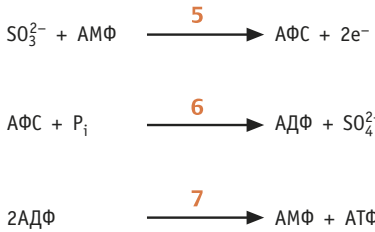


Биокоррозия существенно разрушает железные трубы подземных коммуникаций.

Биологическое выщелачивание руды



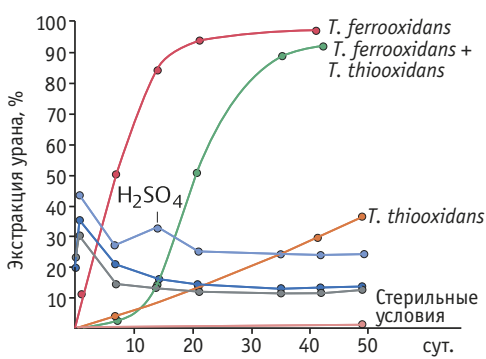
Стадии биохимического процесса



АМФ – аденозинмонофосфат
 АДФ – аденозиндифосфат
 АФС – аденозинфосфосульфат

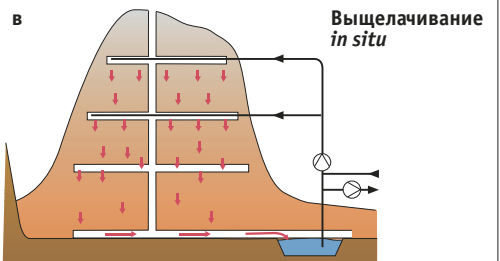
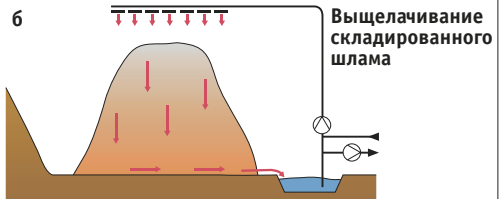
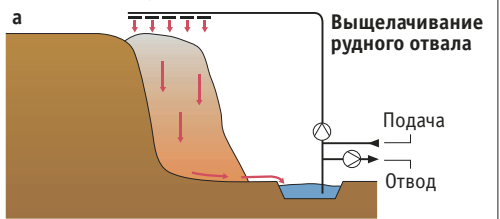
- 1 Сульфидоксидаза
- 2 Тиосульфатгидролаза
- 3 Серная оксидаза
- 4 Сульфитоксидаза
- 5 АФС-редуктаза
- 6 Сульфатаденилилтрансфераза
- 7 Аденилаткиназа

Кинетика выщелачивания

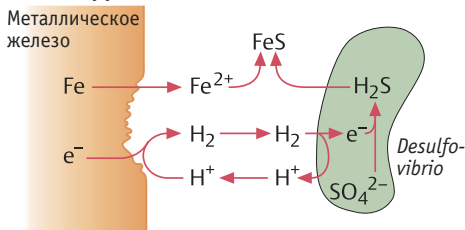


Культуры в качалочных колбах,
 5% урановой руды, зерна < 600 мкм

Варианты осуществления выщелачивания



Биокоррозия



Инсулин

ВВЕДЕНИЕ. Инсулин – это пептидный гормон, регулирующий уровень глюкозы крови. При лечении сахарного диабета (*Diabetes mellitus*) инсулин незаменим. До 1985 г. инсулин получали из отходов мясной промышленности (поджелудочная железа крупного рогатого скота и свиней). Современная технология производства инсулина основана на использовании рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*. Объем рынка инсулина составляет около 8 тонн в год и оценивается в 5 млрд долларов США.

DIABETES MELLITUS (сахарный диабет). Это заболевание вызвано нарушениями образования или секреции инсулина в кровь. Более распространен диабет II типа, при котором лечение заключается в дополнительной стимуляции синтеза гормона в организме. При диабете I типа образование собственного инсулина нарушено из-за генетического дефекта, вирусной инфекции или аутоиммунного заболевания, и для поддержания нормального уровня глюкозы крови пациенту необходимы регулярные инъекции инсулина. В мире от диабета страдают 170 млн человек, из которых 60 млн больны диабетом I типа (в Германии ~400 000 пациентов с диабетом I типа). Более 2% населения индустриальных регионов Земли являются диабетиками II типа (в Германии – 2,4 млн).

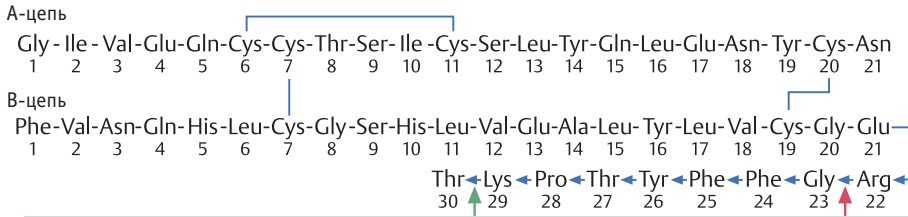
БИОСИНТЕЗ ИНСУЛИНА. Синтез препроинсулина происходит в β -клетках поджелудочной железы животных. Образовавшийся в результате внутриклеточного процессинга проинсулин запасается в аппарате Гольджи. При недостатке глюкозы в крови проинсулин расщепляется мембранными протеазами на три полипептидные цепи – А, В и С. Цепи А и В (21 и 30 аминокислотных остатков соответственно) сближаются и соединяются посредством трех дисульфидных мостиков, а центральная С-цепь (31 аминокислотный остаток) под действием ферментов отщепляется. Так образуется активная форма инсулина.

ПОЛУЧЕНИЕ ИНСУЛИНА. Возможность использования инсулина при терапии диабета была продемонстрирована в 1922 г. Традиционная методика получения инсулина заключалась в экстракции бутанолом из поджелудочной железы крупного рогатого скота или свиней, последующей кристаллизации цинк-содержащей формы инсулина с дальнейшей очисткой гормона методами хроматографии. Количества инсулина, полученного из поджелудочной железы одной свиньи, хватает больному диабетом на 3 дня, а инсулина из одной коровы – на 10 дней. Однако свиной и коровий инсулин по аминокислотному составу отличаются от инсулина человека (в положениях 1 и 2 соответственно), поэтому при длительном приеме чужеродного инсулина у больных может развиваться иммунная реакция. Метод химического синтеза

инсулина, полностью аналогичного человеческому, был предложен еще в 1964 г., однако осуществление в промышленном масштабе такого сложного и дорогостоящего синтеза оказалось экономически нецелесообразным. В 1975 г. был разработан метод получения из поджелудочной свиньи инсулина, полностью идентичного инсулину человеку. Для этого происходит ферментативное замещение остатка Ala³⁰ в В-цепи на остаток Thr³⁰ с помощью иммобилизованной карбоксипептидазы Y. Промышленное получение инсулина методами генетической инженерии стало возможным с 1985 г. В качестве клеток-хозяев, продуцирующих инсулин, были выбраны клетки *Escherichia coli* K12. Частота встречаемости кодонов аминокислот в клетках человека и бактерии значительно различается, поэтому, несмотря на то что кДНК препроинсулина можно выделить из культуры β -клеток человека (она составляет 75% фракции суммарной мРНК этих клеток), для создания экспрессирующего вектора более целесообразно оказалось получать кДНК методом химического синтеза. В ранних методах синтеза А- и В-цепи экспрессировали отдельно, очищали, а затем после химического окисления цистеина и образования дисульфидных мостиков получали активный инсулин. В современном производстве проинсулин в клетках *Escherichia coli* синтезируется в виде белка, слитого с триптофансинтазой, которую впоследствии отщепляют протеолизом. Такой проинсулинсодержащий слитый белок составляет до 40% клеточной массы оптимизированных штаммов-продуцентов, таким образом из 40 м³ клеточной культуры после очистки методом обращенно-фазовой хроматографии удается получить около 100 г чистого инсулина. Разработан способ получения укороченного, так называемого «мини-проинсулина» в клетках *Saccharomyces cerevisiae*.

НОВЫЕ ТИПЫ ИНСУЛИНА. Было показано, что препарат инсулина человека, содержащего в В-цепи Lys²⁸Pro²⁹ вместо Pro²⁸Lys²⁹ значительно быстрее усваивается организмом, что помогает больным диабетом планировать свое питание. Такой *лизпро*-инсулин, как и обычную форму, получают в рекомбинантном штамме *E. coli*. В настоящее время изучаются возможности терапевтического применения других производных инсулина: Pro²⁸Asp (инсулин аспарт – короткого действия, разрешен к применению), Asn³LysLys²⁹Glu (В-цепь, инсулин глутизин – аналог инсулина быстрого действия, фаза III), Thr³⁰Arg³¹Arg (В-цепь) Asn²¹Gly (А-цепь, инсулин гларгин – длительного действия), а также инсулина, содержащего Thr³⁰_{del}Lys²⁹, ацетилированного жирной кислотой (препарат «Инсулин Детемир»).

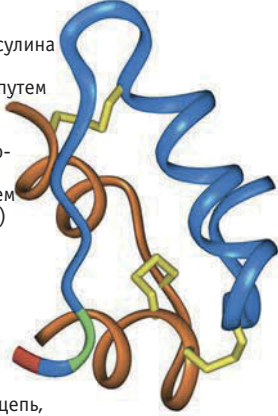
Первичная структура инсулина человека



С-концевой Thr отщепляется карбоксипептидазой Y, а октапептид – трипсином

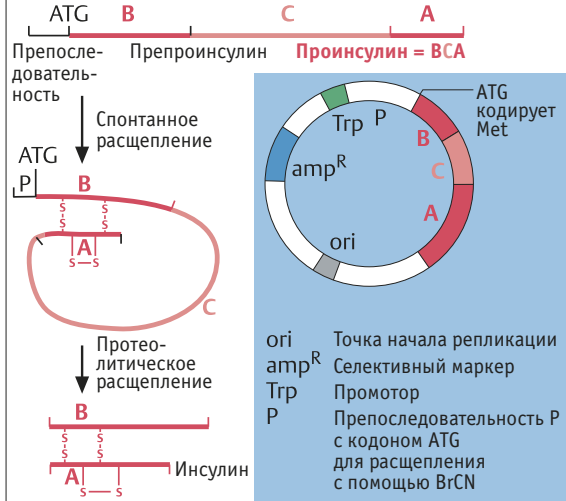
Пространственная структура молекулы инсулина

Структура инсулина свиньи была установлена путем рентгено-структурного анализа монокристалла с разрешением 0,18 нм (9INS)



Коричневым цветом показана А-цепь, голубым – В-цепь, желтым – дисульфидные мостики, красным – замена Ala³⁰ (инсулин свиньи) на Thr³⁰ (инсулин человека)

Биосинтез инсулина и экспрессирующая плазмида



Структура инсулина из различных источников (С-конец В-цепи)

Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
Arg	Arg	Arg ²²	Arg ²²	Arg
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
Lys ²⁸	Pro ²⁸	Pro ²⁸	Pro	Pro
Pro ²⁹	Lys ²⁹	Lys	Lys	Lys
Thr ³⁰	Thr ³⁰	Thr ³⁰	Ala ³⁰	Ala ³⁰

Трипсин
 Заменен С-концевой октапептид

Карбоксипептидаза Y
 Заменен С-концевой остаток аланина на треонин

Thr³⁰ → Ala³⁰

Замена Lys на Pro – инсулин с повышенной биологической активностью

Рекомбинантный инсулин человека, полученный в клетках *E. coli* K12

Природный инсулин человека

Инсулин свиньи

Инсулин крупного рогатого скота*

* Дополнительные замены двух аминокислотных остатков в А-цепи

Получение рекомбинантного инсулина человека в клетках *E. coli* K12

Биореактор

Объем 40 м³, 30 ч, 37 °С, источник углерода и источник азота

Выделение

Выделение телец включения, удаление клеточных фрагментов

Обработка

1. Расщепление слитого белка по остатку метионина с помощью CNBr
2. Получение S-сульфопродуктов
3. Восстановление S-сульфоцистеина до цистеина
4. Образование дисульфидных мостиков (O₂, pH 10,6)
5. Трипсин/карбоксипептидаза В, удаление С-пептида

~ 2,5 г инсулина человека на 1 м³ за 30 ч

Гормон роста и другие гормоны

ВВЕДЕНИЕ. Гормон роста (фактор роста, соматотропин; ГР; *англ.* Н или GF), как и инсулин – один из самых важных гормонов, получаемых методами генетической инженерии. В организме синтез этого гормона происходит в передней доле гипофиза. Гормон роста принимает участие в регуляции многих обменных процессов. В основе его действия лежат два механизма: при полноценном питании гормон роста ингибирует синтез жиров, а неизрасходованная энергия используется для белкового синтеза, например, в молочных железах. Этим свойством пользуются в животноводстве: добавление гормона роста стимулирует лактацию, а также позволяет получать менее жирное мясо, обогащенное белком. Другой функциональный эффект гормона заключается в стимуляции роста в результате действия инсулиноподобного фактора роста IGF-1, синтезирующегося в клетках печени. Этот фактор индуцирует клеточное деление в большинстве тканей организма.

ГОРМОН РОСТА ЧЕЛОВЕКА – полипептид, состоящий из 191 аминокислотного остатка, имеет два дисульфидных мостика. В 0,1% случаев причина нарушений роста – пониженная секреция гормона роста в гипофизе; причем нормальный рост удается восстановить при парентеральном введении гормона. Более частой причиной нарушений роста являются дефектные рецепторы гормонов роста. Избыточное образование гормона роста в детском и переходном возрасте приводит к гигантизму, а у взрослых его избыток вызывает акромегалию – непропорциональное разрастание пальцев, носа и ушей. Объем рынка гормона роста человека составляет около 1 млрд долл. США (2004 г.).

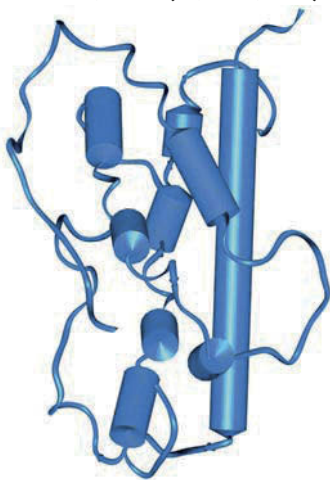
ЖИВОТНЫЙ СОМАТОТРОПИН. Бычий гормон роста (bGF) отличается от гормона роста человека по 67 аминокислотным остаткам. С 1990 г. в США и многих других странах, за исключением Японии и стран ЕС, бычий гормон роста используется в животноводстве для стимуляции образования молока у коров. Свиной гормон роста применяют при откорме свиней для увеличения мышечной массы, а не жира. Усиление лактации и наращивание мышечной массы происходит в результате того, что гормон роста ингибирует синтез жиров, а неизрасходованная энергия используется для синтеза мышечных белков или молочного белка. К настоящему времени нет данных, какое побочное биологическое действие может оказать свинной и бычий соматотропин на человека, в то время как действие гормона роста человека на других млекопитающих считается доказанным. Вероятность биологического воздействия гормона роста, содержащегося в мясной гастрономии, на человека очень мала, так как в пищеварительном тракте белки инактивируются в результате протеолиза и не поступают в

ткани. В результате генно-инженерных манипуляций был получен трансгенный лосось, у которого гормон роста находится под сильным промотором *anti-freeze* белка. Такой лосось в 3–10 раз больше по размеру обычных экземпляров этой рыбы. Благодаря строгой изоляции, а также стерильности выведенного лосося риски экологических последствий такого эксперимента невысоки.

ФЕРМЕНТАЦИЯ И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА. До развития методов генетической инженерии единственным источником гормона роста человека был гипофиз, поэтому гормон был доступен в очень небольших количествах и в недостаточном чистом виде. С 1984 г. началось производство гормона роста человека методом ферментации с использованием клеток *Escherichia coli*. Разработка системы клонирования оказалась очень сложной задачей, так как и сам гормон, и кодирующая его мРНК синтезируются в организме в очень малом количестве. Кроме того, рестрикционный анализ полученной кДНК выявил всего один сайт узнавания рестриктазой. Проблема была решена, когда удалось получить штамм *E. coli* K12, который мог нарабатывать «полусинтетический» гормон роста человека. Фрагмент ДНК, кодирующий первые 24 аминокислоты, был синтезирован химически, и непосредственно за стартовым кодоном был введен триплет, кодирующий метионин. Оставшийся фрагмент, содержащий аминокислотные остатки 25–191, был получен при синтезе кДНК на матрице мРНК из клеток гипофиза человека. Таким образом, эти бактерии создают гормон роста, идентичный гипофизарному, но содержащий дополнительный остаток метионина. Эта замена могла приводить к возникновению иммунных реакций. Современные методы генетической инженерии позволяют получать рекомбинантный гормон роста человека, полностью идентичный природному. Перед использованием полученные гормоны обязательно подвергаются хроматографической очистке.

ДРУГИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГОРМОНЫ. В настоящее время клонированы гены многих гормонов человека, и исследуется возможность их применения в медицине и сельском хозяйстве. С появлением рекомбинантных гормонов открываются новые возможности в терапии многих заболеваний, например применение паратгормона для лечения остеопороза. Фолликулостимулирующий гормон человека (ФСГ, или *англ.* FSH) применяется при диагностике бесплодия, от которого страдают 50–80 млн человек. Объем рынка этого рекомбинантного гетеродимерного гликопротеина, получаемого в культуре клеток CHO, составляет 600 млн долл. США.

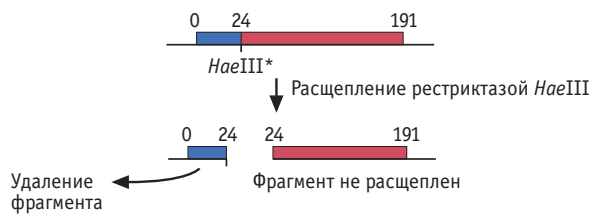
Соматотропин (гормон роста)



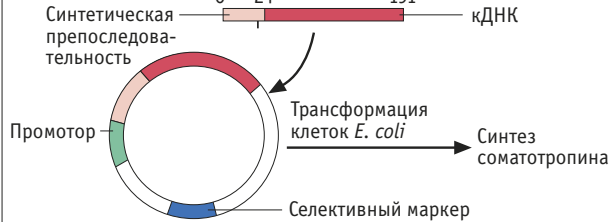
Соматотропин человека.
Разрешение 0,25 нм (1НГУ)

Клонирование гена соматотропина человека

а Получение фрагментов кДНК соматотропина



б Экспрессия



* *HaeIII* – рестриктаза, выделенная из *Haemophilus aegyptius*

Получение и очистка гормонов роста

Стартовая культура

Клетки *E. coli* K12, трансформированные плазмидой, несущей ген гормона роста человека

Биореактор

Питательная среда для *E. coli*, 37 °С

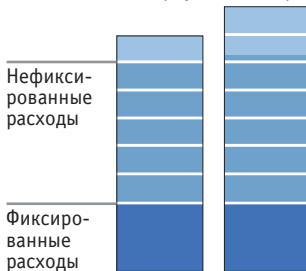
Выделение

Лизис клеток, хроматография, индуцированное изменение заряда молекулы, гель-хроматография и ионообменная хроматография

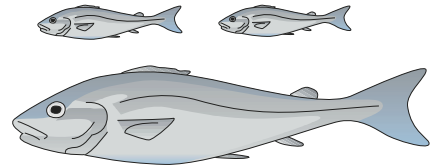
Гормон роста человека (например, нордитропин)

Соматотропин и выработка молока

Прибыль при 25 л молока/сут при 35 л молока/сут



В расходы на корм скоту включены инъекции соматотропина 1 раз в неделю



Трансгенный лосось, несущий клонированный ген гормона роста лосося (наверху – контрольные экземпляры)

Другие гормоны, полученные в виде рекомбинантных продуктов

	Применение	Фирма-производитель	Внедрение
Глюкагон	Гипогликемия	Novo	Допущен к применению
Фолликулостимулирующий гормон	Бесплодие	Serono, Organon и др.	Допущен к применению
Кальцитонин (лососевый)	Остеопороз	Novartis	Допущен к применению
Фрагмент паратиреоидного гормона (ПТГ)	Остеопороз	Eli Lilly	Допущен к применению
Ингибин	Контрацептив		Исследование
Лептин/Адипонектин	Средство, снижающее аппетит		Исследование
Тиростимулирующий гормон	Рак щитовидной железы	Genzyme	Средство для лечения редкого заболевания (орфанный препарат)
Атриальный (предсердный) натрий-уретический пептид	Почечная недостаточность	Genetech/Scios	Исследование

Гемоглобин, сывороточный альбумин и лактоферрин

ВВЕДЕНИЕ. Кровь состоит из плазмы и клеток (эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов). Для организма кровь — самая главная жидкая среда, обеспечивающая транспорт веществ, регулируя температуры, водно-солевой обмен и кислотно-щелочное равновесие, а также защиту от патогенных факторов. Более 20% всех генов человека кодируют белки крови. Гемоглобин эритроцитов служит для доставки кислорода к 10^{13} клеткам организма. Для транспорта в организме нерастворимые в воде вещества часто связываются с сывороточным альбумином. В настоящее время разработаны генно-инженерные методы получения многих белков крови, например ингибитора α -антитрипсина, который переносится кровью и служит для защиты легочной ткани от действия эластазы, и антибактериального агента лактоферрина, содержащегося в молоке. Синтез антител и размножение клеток, участвующих в иммунном ответе, регулируются посредством цитокинов. Гормоны осуществляют регуляцию многих клеточных функций с высокой специфичностью, например под действием факторов роста происходит стимуляция роста тех или иных типов клеток. Вязкость крови регулируется сложным каскадом белковых взаимодействий. В норме эта система предотвращает агрегацию тромбоцитов, а в случае повреждения кровеносного сосуда способствует их связыванию с фибрином. Дефекты такого комплекса приводят к различным заболеваниям. Развитие методов генетической инженерии впервые позволило детально изучить процесс поддержания необходимой вязкости крови и разработать препараты для терапии нарушений в этой системе.

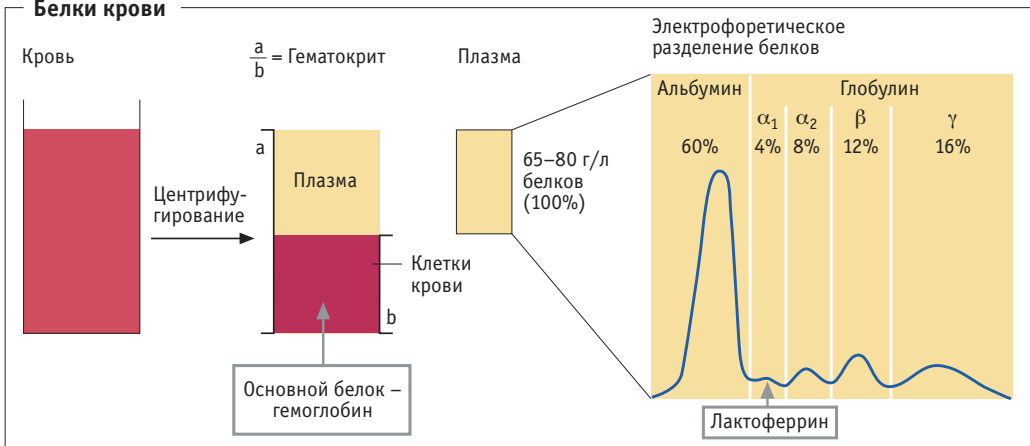
ГЕМОГЛОБИН — белок эритроцитов, обеспечивающий перенос кислорода в организме. Гемоглобин взрослого человека негликозилирован и построен из двух идентичных α - и двух идентичных β -цепей, вместе составляющих тетрамер $\alpha_2\beta_2$ с молекулярной массой 64 кДа. Каждая из цепей несет гемовую группу. Связывание молекулы кислорода с одной гемовой группой повышает сродство остальных гемовых групп к кислороду (аллостерическая регуляция). При сильных кровопотерях пациент получает жизненно необходимое количество гемоглобина в форме концентратов эритроцитов или путем переливания крови. Однако при этом велика вероятность заражения вирусными заболеваниями и возникновения иммунных реакций. Поэтому особенно важным оказалось клонирование гена гемоглобина человека в клетках *Escherichia coli*, дрожжей и в трансгенных свиньях. Перед использованием в медицинских целях экспрессированный гемоглобин тщательно очищают методами хроматографии. Выделенный белок токсичен для клеток печени, а также нестабилен вне эритроцитов: он легко превращается в $\alpha\beta$ -димеры, которые

становятся мишенью для действия клеточных протеиназ. Сейчас ведутся исследования с целью исправления этих существенных недостатков, например, путем микрокапсулирования гемоглобина для его направленной доставки.

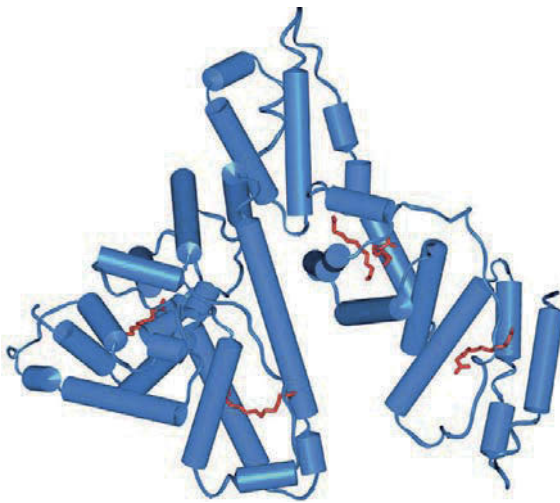
СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН. Этот негликозилированный белок (M_r 69) синтезируется в печени в виде преальбумина. Сывороточный альбумин составляет значительную часть белков плазмы крови (около 60%), поэтому он играет решающую роль в поддержании осмотического давления крови. Способность к комплексообразованию позволяет этому белку выполнять транспортную функцию путем связывания с такими труднорастворимыми веществами, как, например, липиды. Препараты, содержащие сывороточный альбумин, используют прежде всего при шоковых состояниях, вызванных большой кровопотерей, а также при различных заболеваниях почек и печени. Источником сывороточного альбумина служит кровь доноров, из которой белок выделяют в результате многоступенчатой хроматографической очистки и высаливания. Прогреванием препаратов при 60 °С в течение нескольких часов удается обезвредить большинство вирусов и других патогенных факторов, которые могут присутствовать в крови донора, однако известны случаи, когда при переливании крови происходило заражение пациента. Этим объясняются многочисленные попытки получить сывороточный альбумин как рекомбинантный белок в процессе ферментации. Так были получены рекомбинантные штаммы *Bacillus subtilis*, *E. coli*, пекарских дрожжей и *Pichia pastoris*, продуцирующие сывороточный альбумин, и выведены трансгенные растения и животные (козы), в которых синтезируется этот белок. Однако такие препараты пока находятся на стадии испытаний и не допущены к медицинскому применению.

ЛАКТОФЕРРИН (M_r 69) обладает антибактериальными и противовоспалительными свойствами, вероятно, благодаря своей способности связывать ионы Fe^{3+} . В материнском молоке содержится до 100 мг/л лактоферрина. Для получения рекомбинантного лактоферрина его ген встраивали под промотор α_s1 -казеина в молочных железах коровы, выход белка в молоке таких трансгенных коров составлял до 30 г/л. Предложено применение этого препарата как общеукрепляющего средства, его следует принимать перорально.

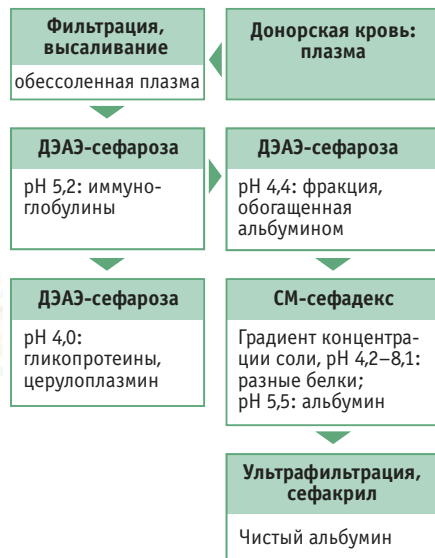
Белки крови



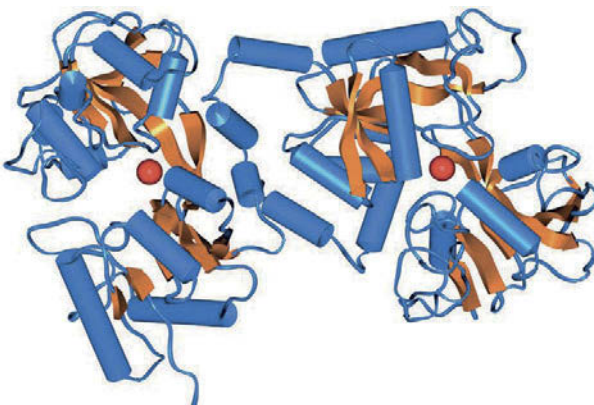
Получение альбумина фракционированием донорской крови



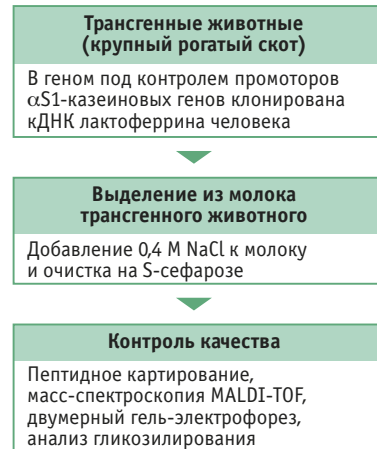
Сывороточный альбумин человека: разрешение 0,24 нм; красным показаны 5 остатков метионина (1 HSA)



Лактоферрин



Лактоферрин человека: разрешение 0,24 нм; красным показаны ионы Fe (1 ВJ5)



Факторы свертывания крови

ВВЕДЕНИЕ. Для предотвращения кровопотери при повреждении сосудов существует эффективный механизм, заключающийся в образовании тромба. Этот процесс, называемый гемостазом, представлен сложным набором реакций, проходящим в несколько этапов: активация зимогенов (предшественников протеиназ), протеолиз и ингибирование протеолиза. Сложная система регуляции свертывания крови предотвращает образование тромбов в неповрежденных сосудах. При свертывании крови растворимый белок фибриноген превращается в нерастворимый полимер фибрин путем протеолиза, катализируемого сериновой протеиназой тромбином. В таком «мягком» тромбе фактор XIIIa (фермент трансглутаминаза) обеспечивает формирование амидных связей, что приводит к формированию нерастворимого сгустка. В свою очередь тромбин образуется из протромбина под действием фактора Xa, а в регуляции этого процесса принимают участие белки фактора VIII. Мутации в генах белков фактора VIII являются причиной наиболее распространенных генетических заболеваний крови — гемофилии A и B.

ГЕМОФИЛИЯ. Первые упоминания об этой болезни встречаются на глиняных дощечках, дошедших до нас из Древнего Египта. Существует три клинических типа заболевания: гемофилия A, гемофилия B и болезнь фон Виллебранда. Гемофилия A встречается только у мужчин с частотой 1 на 5000. Причина патологии заключается в нарушении биосинтеза фактора VIII. У больных гемофилией A содержание фактора VIII в крови составляет менее 1% нормы, по этой причине спонтанное кровотечение, как правило, приводит к смерти. В генах фактора VIII, расположенных на X-хромосоме, у больных гемофилией A обнаруживается инверсия интрона F8A, которая и приводит к нарушению биосинтеза белка в клетках печени. Фактор VIII — это гликопротеин (M_r 300), представляющий собой одну полипептидную цепь из 2332 аминокислотных остатков. Она содержит 25 участков гликозилирования, и содержание сахара может достигать 35%. Его пространственная структура установлена с помощью электронной криомикроскопии. Ген фактора VIIIa имеет размер ~186 т.п.н. и содержит 26 экзонов. Посттрансляционное гликозилирование особенно важно в B-домене белка, который под действием тромбина отщепляется, что и приводит к активации фактора VIII. Болезнь фон Виллебранда, встречающаяся с частотой 1 на 1000 среди мужчин и женщин, вызвана нарушениями биосинтеза фактора фон Виллебранда (vWF) на внутренней стенке кровеносных сосудов. Ген vWF находится в хромосоме 12. Фактор фон Виллебранда, как и фактор VIII, — гликопротеин большого размера со сложной структурной органи-

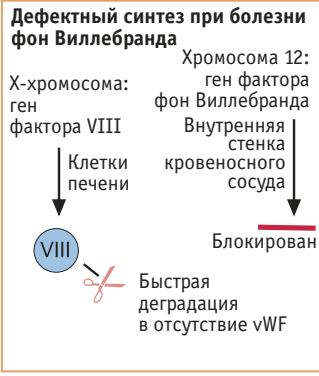
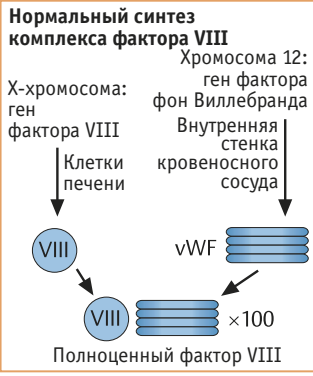
зацией. Около 100 молекул vWF связываются с молекулой фактора VIII, и образующийся комплекс vWF–VIII активирует систему факторов X/IX_a, которая обеспечивает агрегацию тромбоцитов при образовании тромба. При гемофилии B, встречающейся только у мужчин с частотой 1 на 25 000, нарушен синтез фактора IX — гликопротеина с молекулярной массой 55 кДа. Наряду с фактором VIII фактор IX участвует в активации фактора X. Ген, кодирующий фактор IX, расположен на X-хромосоме (Xq27) и имеет размер ~34 т.п.н.

КЛОНИРОВАНИЕ. При клонировании факторов крови, впервые осуществленного в 1982 г. компаниями Genentech и Genetic Institutes, оказалось, что главное затруднение связано с очень низким содержанием мРНК (лишь 10^{-5} от всей мРНК в печени). Полную кДНК удалось выделить из клеток лимфомы методом «прогулки по геному», а затем была создана векторная система, включающая в себя элементы вируса SV40 и аденовируса. Такая система позволила экспрессировать факторы крови в CHO- и ВНК-клетках.

ПРОИЗВОДСТВО. Производство лекарственных препаратов, содержащих факторы крови, началось в 1964 г. Факторы VIII, IX и vWF получали криопреципитацией из крови доноров, а затем очищали методами иммунохроматографии. Однако при этом значительно возрастала степень риска заражения реципиента через кровь донора, так как, например, для обеспечения одного больного гемофилией A фактором VIII в течение года требовалась кровь нескольких тысяч доноров. В результате более 60% пациентов, которые использовали донорские факторы крови, приобрели инфекционные заболевания. По этой причине генно-инженерный метод получения факторов VIII и IX, разработанный в 1992 г., имеет огромное значение. Из-за высокого уровня гликозилирования фактора VIII синтез его биологически активной формы возможен исключительно в животных клетках (CHO- и ВНК-клетках), где уровень экспрессии чрезвычайно низок и составляет микрограммы продукта на литр клеточной культуры. Объем его рынка составляет около 500 млн долл. США в год (2004 г.).

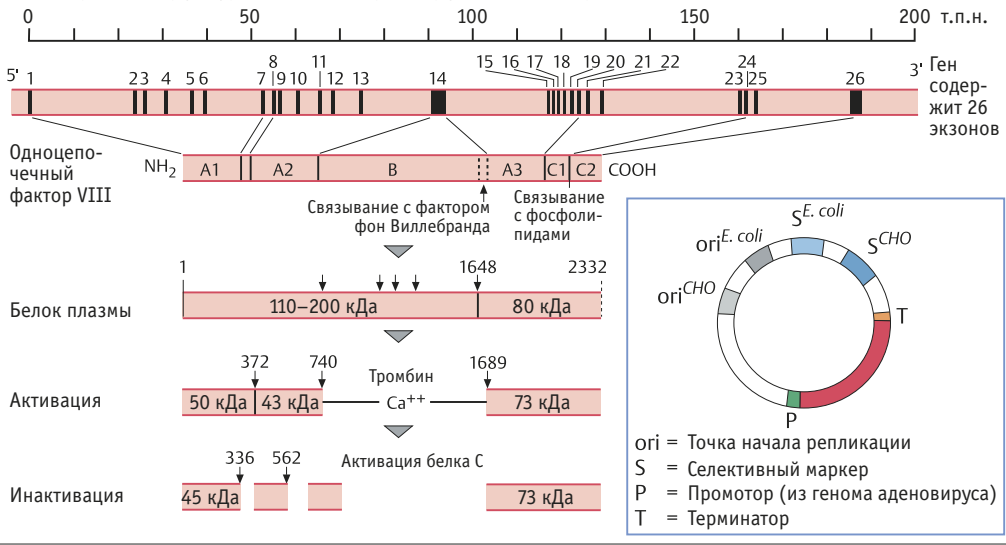
Тяжелые болезни крови

	Гемофилия А	Болезнь фон Виллебранда	Гемофилия В
Наследуемость	1:5000, только мужчины	1:1000, мужчины и женщины, как правило аутосомно-доминантный тип наследования	1:25000, преимущественно мужчины
Клинические проявления	Мышечные и суставные кровотечения, кровоизлияния в мозг	Кровотечения из носа, значительные потери крови в менструальном цикле, продолжительные кровотечения при порезах	В детстве спонтанные кровоизлияния в суставы
Хромосомный локус	Xq28	12p12	Xq27

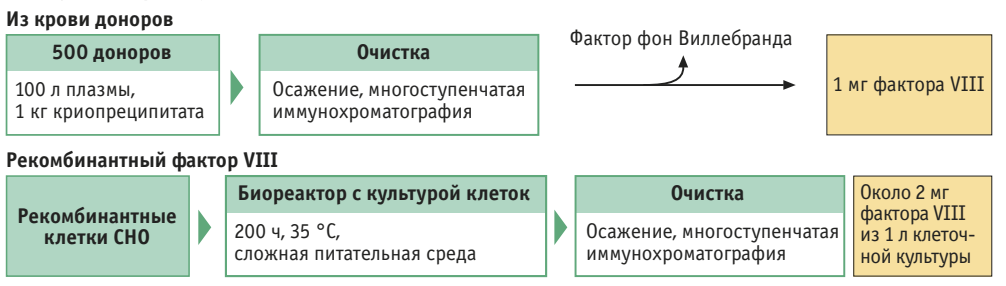


Комплекс фактора VIII состоит из фактора VIII и фактора фон Виллебранда (vWF)

Фактор VIII: структура гена и экспрессирующий вектор



Получение фактора VIII



Антикоагулянты и тромболитики

ВВЕДЕНИЕ. Образование тромбов (инфаркт миокарда, инсульт, закупорка сосудов) является самой распространенной причиной смерти в большинстве развитых стран. В Германии от тромбозов ежегодно умирают 60 000 человек. Антикоагулянты препятствуют образованию первичных тромбов (в том числе при операциях), а тромболитики осуществляют протеолитическое разрушение тромбов. В медицине находят применение такие антикоагулянты, как гепарин и производное кумарина, а также рекомбинантные ингибиторы тромбина — гирудин (природный источник — медицинские пиявки) и антитромбин III человека (АТ-III). В качестве тромболитиков используют бактериальную стрептокиназу, а также препараты урокиназы и тканевого активатора плазминогена (tPA и rPA), полученные методами генетической инженерии.

ГЕПАРИН — серосодержащий глюкозаминогликан (мукополисахарид) с M_r от 3 до 60 кДа. Его экстрагируют из кишечника свиньи или легких крупного рогатого скота. Гепарин синтезируется тучными клетками и, оказавшись в плазме крови, активирует АТ-III, который в свою очередь связывается с тромбином и препятствует образованию фибрина.

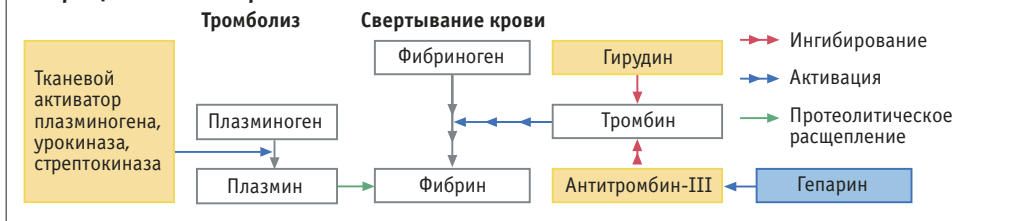
ГИРУДИН — ингибитор тромбина, обнаруженный в секрете слюнных желез медицинской пиявки. В настоящее время рекомбинантный гирудин получают ферментацией в клетках *Escherichia coli* и в других организмах-хозяевах. Действие гирудина аналогично действию АТ-III: он связывается с тромбином, тем самым препятствуя образованию фибрина из фибриногена.

ТКАНЕВОЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА (*tissue plasminogen activator*, tPA). Расщепление фибрина при заживлении раны осуществляется сериновой протеиназой плазмином. Активная форма плазмина образуется из плазминогена под действием тканевого активатора плазминогена (tPA, M_r 72). Это еще одна сериновая протеиназа, которая специфически расщепляет пептидную связь между остатками аргинина и валина (в положениях 561 и 562) в молекуле плазминогена. Белок построен из пяти доменов, функции которых установлены на основании гомологии с другими изученными белками. Функция двух доменов, имеющих форму торов, заключается в связывании с молекулой фибрина, а так называемый протеазный домен содержит активный центр фермента. Ген tPA человека был клонирован в 1982 г., а с 1988 г. препараты этого белка поступили на рынок. Наличие в зрелом tPA восьми дисульфидных связей и трех крупных углеводных компонентов, составляющих ~25% массы и необходимых для связывания с субстратом, не позволяет использовать бактериальные клетки в качестве клеток-хозяев. Для получения

рекомбинантного tPA выбирают клетки мышей или клеточные линии CHO, а образующийся белок очищают различными способами, включающими осаждение в кислой среде, а также ионообменную, гидрофобную и аффинную хроматографию. Мутанты производят фермент с искусственно измененным сайтом гликозилирования и четырьмя аминокислотными заменами (TNK-tPATM), который прочно связывается с фибрином и имеет более продолжительное время полураспада в сыворотке. В этой связи вместо использования инфузии можно провести однократное введение. Мутанты *E. coli* с нарушенной функцией гликозилирования синтезируют фермент, лишенный петлевого-1 и eGF-доменов (RepilysinTM), однако его выделение из телец включения оказывается затруднительным. По сравнению с tPA время пребывания этого белка в сыворотке в 3–4 раза больше, а аллергенные свойства выражены слабее. tPA также секретируется с молоком трансгенных коз и овец, которые трансформированы вектором, содержащим фрагмент tPA-кДНК под промотором лактальбумина. Белок tPA, кроме того, получают из молока трансгенных коз и овец, в которых ген tPA клонирован за промотором лактальбумина. Для контроля однородности полученного таким способом tPA требуется применение специальных аналитических методов.

ДРУГИЕ ТРОМБОЛИТИКИ. Урокиназа — сериновая протеиназа; в виде проурокиназы присутствует в сыворотке крови и в моче. Подобно tPA, урокиназа гидролизует плазминоген с образованием плазмина. Обнаружены две формы белка с M_r 54 и 30: белок меньшего размера образуется из большего при автолизе, и обе формы обладают биологической активностью. Урокиназу выделяют из мочи, культуры клеток почек человека или в виде рекомбинантного продукта из клеток *E. coli*. Стрептокиназа образуется в различных гемолитических стрептококках. Этот белок не обладает каталитической активностью, однако вызывает конформационные изменения в молекуле плазминогена, что приводит к автолизу с образованием плазмина. Стрептокиназу получают из культур стрептококков методами хроматографии. Применение других, более дешевых способов очистки белка, связано с риском возникновения сильных иммунных реакций.

Упрощенная схема тромболитиза



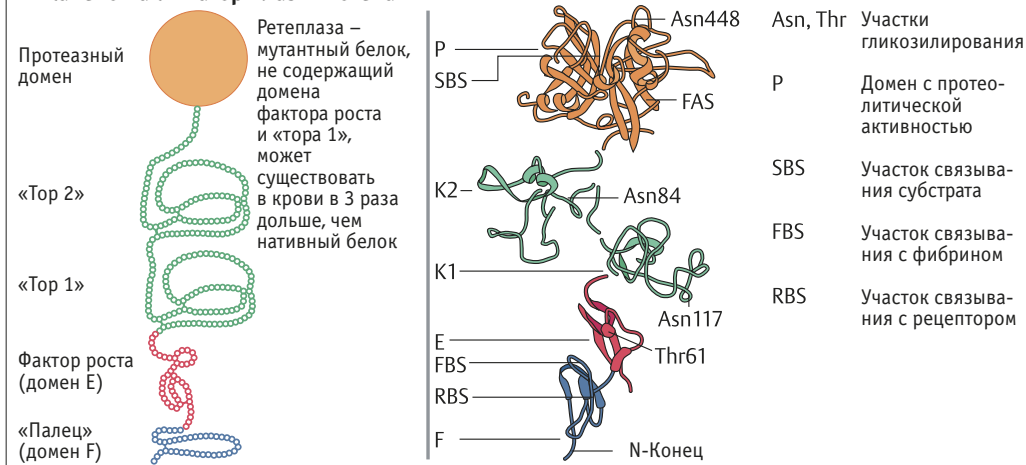
Антикоагулянты (А) и тромболитики (Т)

	Тип	Действие	Производитель
Гепарин	А	Серосодержащий полисахарид, связывается с антитромбином III и инактивирует тромбин	Celsus
Гирудин	А	Ингибирует тромбин	Novartis, Behringwerke*
Антитромбин-III	А	Ингибирует тромбин	Genzyme Transgenic Corp.
Стрептокиназа	Т	Активирует плазминоген	Kabi Upjohn*
Урокиназа	Т	Активирует плазминоген	Grüenthal*
Тканевой активатор плазминогена	Т	Активирует плазминоген	Genentech*, Boehring, Ingelheim*, Roche*

* Препарат разрешен к применению

■ Природное соединение ■ Рекомбинантный белок

Тканевой активатор плазминогена



Получение тканевого активатора плазминогена (пример)



Ингибиторы ферментов

ВВЕДЕНИЕ. В современной медицине широко используются ингибиторы ферментов. Например, ингибитор протеаз аprotинин, получаемый из отходов при переработке мяса, применяют для терапии шоковых состояний, а рекомбинантный α_1 -антитрипсин в будущем, возможно, найдет применение для лечения эмфиземы легких. Множество микробных ингибиторов протеаз (лейпептины, пепстатин, антипаин, химостатин, эластиналь) пока не нашли применения в медицине, однако активно используются в фундаментальных исследованиях. Ингибитор α -гликозидазы акарбозу успешно применяют при лечении диабета, а ингибитор панкреатической липазы тетрагидролипстатин — при лечении ожирения.

АПРОТИНИН — полипептид, состоящий из 58 аминокислот (M_R 6511), ингибирует такие протеазы как трипсин, химотрипсин и плазмин. Другое название аprotинина — панкреатический ингибитор трипсина. Константа ингибирования трипсина с помощью аprotинина составляет 10^{-11} М. Лекарственные препараты, содержащие аprotинин (Trasylol®), применяют для лечения панкреатитов, при трансплантации органов, а также при сильных кровотечениях и шоковых состояниях. Перспективным считается применение аprotинина в работе с культурами животных клеток: в этом случае аprotинин препятствует протеолитическому расщеплению рекомбинантных белков. Аprotинин экстрагируют из поджелудочной железы или легких крупного рогатого скота, а затем очищают хроматографическими методами. Белок негликозилирован, следовательно, может быть получен как рекомбинантный продукт в бактериальных клетках, в том числе в *Escherichia coli*.

α_1 -АНТИТРИПСИН (α -АТ). Этот гликопротеин (M_R 54 кДа), закодированный в 14-й хромосоме человека, образуется в печени и при концентрации ~2 г/л ингибирует более 90% всей ферментативной активности, проявляющейся во фракции α_1 -глобулинов сыворотки крови. Одним из субстратов α_1 -антитрипсина является эластаза, образующаяся в нейтрофильных гранулоцитах и осуществляющая протеолитическое расщепление эластина — основного структурного компонента легочной ткани. Таким образом, α -АТ предотвращает разрушение ткани легких. В Северной Европе у населения нередко встречается генетический дефект α -АТ — замена Lys⁵³ на Glu (такой α -АТ называется α -АТ Z-типа). В случае такой мутации значительно снижается уровень секреции α -АТ из клеток печени, и его содержание в крови составляет лишь 15% нормы. Наличие α -антитрипсина Z-типа особенно опасно для курящих, так как в табаке содержатся вещества, окисляющие Met³⁵⁸ α -АТ, который играет важную роль при ингибировании эластазы. Под действием эластазы в легочной ткани

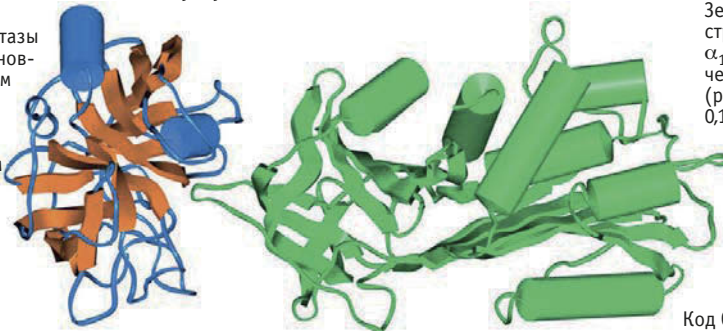
развиваются эмфиземы, что в большинстве случаев вызывает удушье и смерть. Внутривенное введение ингибиторов эластазы (около 200 г в год) позволяет замедлить развитие болезни. Основным источником α -АТ является кровь доноров. Для получения рекомбинантного ингибитора предпочитают клетки *Saccharomyces cerevisiae*, так как биологически активный α -АТ должен быть гликозилирован, следовательно, продукт, образующийся в клетках *E. coli*, оказывается неактивным. Экономически выгодна экспрессия рекомбинантного α -АТ, слитого с β -лактальбумином, в молочных железах овец.

АКАРБОЗА (Glucobay®) — это псевдотетрасахарид, получаемый из культур *Actinoplanes utahensis*. Акарбоза является конкурентным ингибитором α -гликозидаз. Под действием акарбозы в желудочно-кишечном тракте снижается уровень глюкозы, поэтому ее применяют в качестве антидиабетического средства. Производство акарбозы основано на микробной ферментации. К настоящему времени клонированы некоторые гены, участвующие в биосинтезе акарбозы.

ЛИПСТАТИН (ЛИПОСТАТИН) — липофильный эфир, содержащий β -лактоновое кольцо и боковую цепь, несущую N-формил-L-лейцин. Это вещество получают из культуры *Streptomyces toxytricinii*. В результате каталитического гидрирования из липстатина образуется тетрагидролипстатин (Xenical®). Оба вещества (липстатин и тетрагидролипстатин) ковалентно связываются с остатком серина в активном центре липаз. При оральном применении этих веществ в желудочно-кишечном тракте происходит ингибирование панкреатической липазы, осуществляющей гидролиз триглицеридов, а переваривание свободных жирных кислот не нарушается. По этой причине при ожирении назначают прием тетрагидролипстатина. Липстатин и тетрагидролипстатин получают химическим синтезом или ферментацией в клетках *Streptomyces toxytricinii* с последующей экстракцией и хроматографической очисткой. Объем рынка в США составляет около 500 млн долл. (2004 г.).

α_1 -Антитрипсин – ингибитор протеаз

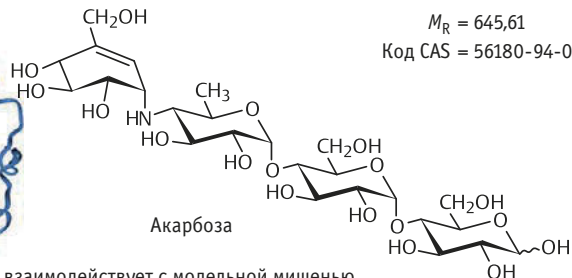
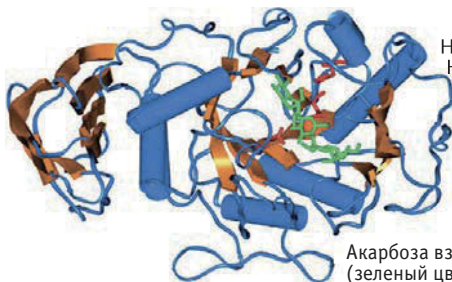
Структура эластазы человека, установленная методом рентгено-структурного анализа, с разрешением 0,16 нм (1-EGS)



Зеленым показана структура α_1 -антитрипсина человека (разрешение 0,16 нм) (1-ATS)

$M_R = 54$ кДа
Код CAS = 9041-92-3

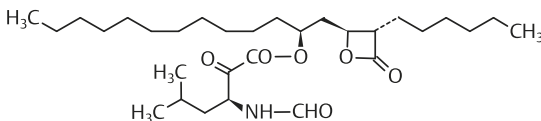
Акарбоза – ингибитор α -глюкозидазы



$M_R = 645,61$
Код CAS = 56180-94-0

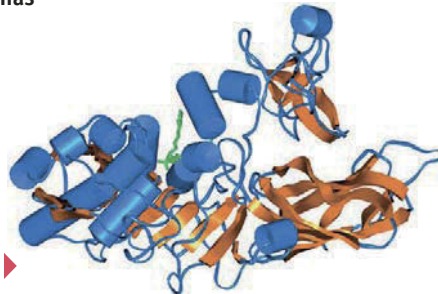
Акарбоза взаимодействует с модельной мишенью (зеленый цвет) панкреатической амилазы свиньи (1РАА). По данным рентгено-структурного анализа с разрешением 0,23 нм

Тетрагидроксилипстатин (Xenical®) – ингибитор липаз



$M_R = 495,74$
Код CAS = 96829-58-2

Структура комплекса тетрагидроксилипстатина (зеленый цвет) с панкреатической липазой человека (1 HUP). Разрешение 0,23 нм



Получение ингибиторов

α_1 -Антитрипсин

Трансгенные овцы «Трасу»

Молоко

Выделение и очистка

Осаждение казеина, хроматография

Выход продукта: 10 мг чистого α_1 -антитрипсина/л молока

Акарбоза

Предферментация

Штамм–суперпродуцент *Actinoplanes utahensis*

Биореактор

Объем несколько кубометров; среда, содержащая крахмал; мальтоза, 5–6 сут при 28 °С

Выделение и очистка

Фильтрация, ионообменная хроматография

Выход продукта: несколько г/л

Тетрагидроксилипстатин

Предферментация

Штамм–суперпродуцент *Streptomyces toxytricinii*

Биореактор

Объем несколько кубометров; среда, содержащая крахмал, или декстрин; соевая мука, 124 ч при 28 °С

Выделение и очистка

Фильтрация, экстракция этилацетатом, обращенно-фазовая хроматография

Выход продукта: несколько г/л

Иммунная система

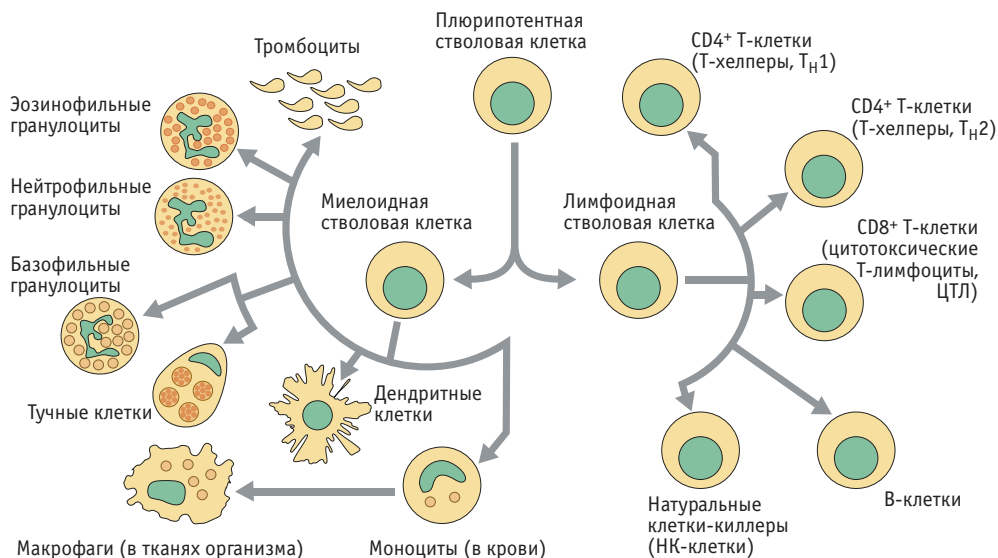
ВВЕДЕНИЕ. Иммунная система защищает высшие организмы от инфекционных болезней и многих патогенов. Функционирование иммунной системы обеспечивается специализированные клетки, которые общаются между собой и другими клетками организма с помощью особых сигнальных веществ-регуляторов. Цитотоксические Т-клетки иммунной системы способны узнавать не только возбудителей болезни, но и собственные поврежденные клетки организма (апоптоз), в том числе раковые клетки. Т-клетки также принимают участие в отторжении чужеродной ткани при трансплантации. Генетически запрограммированное разнообразие и изменчивость иммунной системы позволяет ей приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды. Нарушения функционирования иммунной системы приводят к различным патологиям, среди которых иммунодефицит, аллергии, аутоиммунные болезни. В регуляции иммунной системы принимают участие множество веществ (цитокины, факторы роста и др.), некоторые уже доступны как рекомбинантные продукты. В настоящее время изучаются возможности их терапевтического применения.

КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ. В костном мозге продуцируются гематопоэтические стволовые клетки, которые затем дифференцируются в миелоидные или лимфатические стволовые клетки. Миелоидные стволовые клетки дают начало тромбоцитам, гранулоцитам и макрофагам, а из лимфатических стволовых клеток образуются лимфоциты, поступающие в кровь и лимфатическую систему. В организме здорового взрослого человека присутствует около 10^{12} «наивных» лимфоцитов, которые еще не вступали в контакт с антигенами. При взаимодействии таких клеток с антигеном (или под действием сигнальных веществ) происходит активация лимфоцитов, и путем селективного клонирования образуется большое количество дочерних клеток, специфических к этому антигену. Лимфоциты продвигают дифференцировку до В-клеток и Т-лимфоцитов. Созревшие в костном мозге В-клетки поступают в селезенку или лимфатические узлы и в ответ на действие антигена синтезируют антитела (гуморальный иммунный ответ). Клеточный иммунный ответ осуществляется Т-лимфоцитами. Т-лимфоциты созревают в тимусе. Там они взаимодействуют с молекулами главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС), экспонированными на поверхности клеток. В результате этого взаимодействия образуются специфические поверхностные структуры с различными функциями. В создании клеточного иммунного ответа важная роль принадлежит цитокинам — они секретируются Т-лимфоцитами. Например, клетки-помощники (Т-хелперы) выделяют интерлейкины, которые ак-

тивируют деление и созревание В-клеток. Т-хелперы несут на своей поверхности гликопротеин CD4. Цитотоксические Т-лимфоциты (клетки-киллеры) обладают способностью лизировать зараженные вирусом клетки и выделять цитокины: γ -интерферон и лимфотоксин α . На поверхности клеток-киллеров находится гликопротеин CD8.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ЦИТОКИНЫ. В организме существуют различные специфические механизмы иммунного ответа на инфекции, вызываемые вирусами, бактериями или паразитами. Антитела обладают способностью специфически связываться с внеклеточными патогенами или их токсинами, и такие комплексы служат сигналом для макрофагов, которые уничтожают патоген. Внутриклеточные патогены, например микобактерии или вирусы, а также трансформированные клетки, экспрессирующие гетерологичный белковый продукт, разрушаются по другому механизму: в результате встречи таких патогенов с макрофагом на его поверхности оказываются экспонированными фрагменты лизированных клеток. Это запускает целый каскад реакций, приводящих к разрушению инфицированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. При диабете II типа (аутоиммунное заболевание) собственные белки β -клеток поджелудочной железы воспринимаются иммунной системой как чужие и разрушаются под действием клеток-киллеров. Взаимодействие большого количества клеток, участвующих в формировании иммунного ответа, осуществляется посредством цитокинов. Клетки иммунной системы несут на своей поверхности рецепторы для цитокинов. Формирование иммунного ответа в организме регулируется по сложному механизму. Факторы роста, специфические для различных типов клеток, обеспечивают образование новых клеток иммунной системы. В настоящее время активно изучаются возможности использования рекомбинантных цитокинов и факторов роста в медицинских целях, и в некоторых случаях уже разработаны стратегии их терапевтического применения.

Процесс кроветворения и иммунный ответ: типы клеток



Некоторые цитокины и факторы роста

	Название	Тип клетки, где образуется цитокин	Функция
Активация лимфоцитов	Интерлейкин-2	T _H 1, (ЦТЛ)	Пролиферация Т-клеток
	γ-Интерферон	T _H 1, ЦТЛ	Активация макрофагов
	Интерлейкин-4	T _H 2	Фактор роста В-клеток
	Интерлейкин-3	T _H 1, T _H 2, (ЦТЛ)	Пролиферация гематопоэтических клеток
Местное воспаление	Интерлейкин-9	T-клетки	Активация тучных клеток
	α-Интерферон	Лейкоциты, фибробласты	Индукция синтеза антигенов МНС класса I
	ФНО-α	Макрофаги, клетки-киллеры	Развитие местного воспаления
Системные эффекты и специфические воздействия на костный мозг	Интерлейкины 1α, 1β	Различные типы клеток	Повышение температуры, пролиферация гематопоэтических клеток
	Интерлейкин-6	T _H 2, макрофаги	Индукция синтеза белков острой фазы
	Эритропоэтин	Почки	Активация роста эритробластов
	Колонистимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов	T _H 1, (T _H 2), (ЦТЛ)	Активация пролиферации предшественников гранулоцитов, макрофагов и дендритных клеток

Терапевтическое применение цитокинов и факторов роста

Инфекции	Злокачественные опухоли
Шоковые состояния	Аутоиммунные заболевания
Заболевания иммунной системы	Аллергические реакции
Нарушения клеточного роста	Отторжение трансплантата

Стволовые клетки

ВВЕДЕНИЕ. Стволовые клетки способны к неограниченному росту в культуре, и под действием особых факторов они дифференцируются в специализированные клетки. Стволовые клетки обнаруживаются не только на ранних стадиях развития эмбриона (эмбриональные стволовые клетки), но также во многих тканях взрослого организма. Стволовые клетки являются незаменимым объектом для фундаментальных исследований, в частности для изучения молекулярных основ дифференцировки клеток (биология развития). Стволовые клетки также имеют большие перспективы в медицине (клеточная терапия, тканевая инженерия).

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. На самом раннем этапе зародышевого развития (стадия морулы) все клетки организма, берущие начало от оплодотворенной яйцеклетки, являются тотипотентными, то есть обладают способностью к дифференцировке в различные типы клеток. Если на этой стадии морула делится пополам, образуются однояйцевые (монозиготные) близнецы. По прошествии четырех дней после оплодотворения из морулы в результате многократного клеточного деления формируется бластоциста, содержащая первые дифференцированные клетки: поверхностные бластомеры становятся эпителиоподобными клетками, а клетки внутренней полости бластулы сохраняют плюрипотентность. Такой пул эмбриональных стволовых клеток сохраняется и на последующих стадиях развития эмбриона: они дифференцируются в различные типы клеток, например в клетки крови или кожных покровов. У зародыша человека к восьмой неделе после оплодотворения большинство эмбриональных стволовых клеток уже дифференцировано. Таким образом, эмбриональные стволовые клетки можно получить: 1) из бластоцисты человека, если в результате оплодотворения *in vitro* образуется множество бластоцист, из которых необходима лишь одна (или несколько); 2) из эмбриональной ткани при абортах; 3) из культуры клеток, полученных в результате перенесения диплоидного клеточного ядра в яйцеклетку, собственное ядро которой было предварительно удалено, и развившихся до стадии бластоцисты (клонирование животных).

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА.

Мультипотентные стволовые клетки костного мозга лишь короткое время находятся в кровяном русле, а затем они дифференцируются и дают начало всем линиям клеток крови. Стволовые клетки были обнаружены и в других тканях взрослых животных: например стволовые клетки нейронов (в удаленной ткани мозга). В экспериментах с животными было показано, что стволовые клетки могут претерпевать «передифференцировку», то есть при трансплантации из

одной ткани в другую приобретать новые свойства, характерные для клеток ткани-реципиента. Введение стволовых клеток костного мозга пациентам, перенесшим инфаркт миокарда, улучшает работу сердца. В случае лейкемии также наблюдается положительный эффект от терапии стволовыми клетками взрослого организма. Очень большое преимущество использования взрослых стволовых клеток заключается в их иммуносовместимости, поскольку донор и реципиент – один и тот же человек. Они обладают врожденными и приобретенными в течение жизни генетическими дефектами. Кроме того, получение стволовых клеток взрослого – значительно более сложная задача, чем получение эмбриональных стволовых клеток.

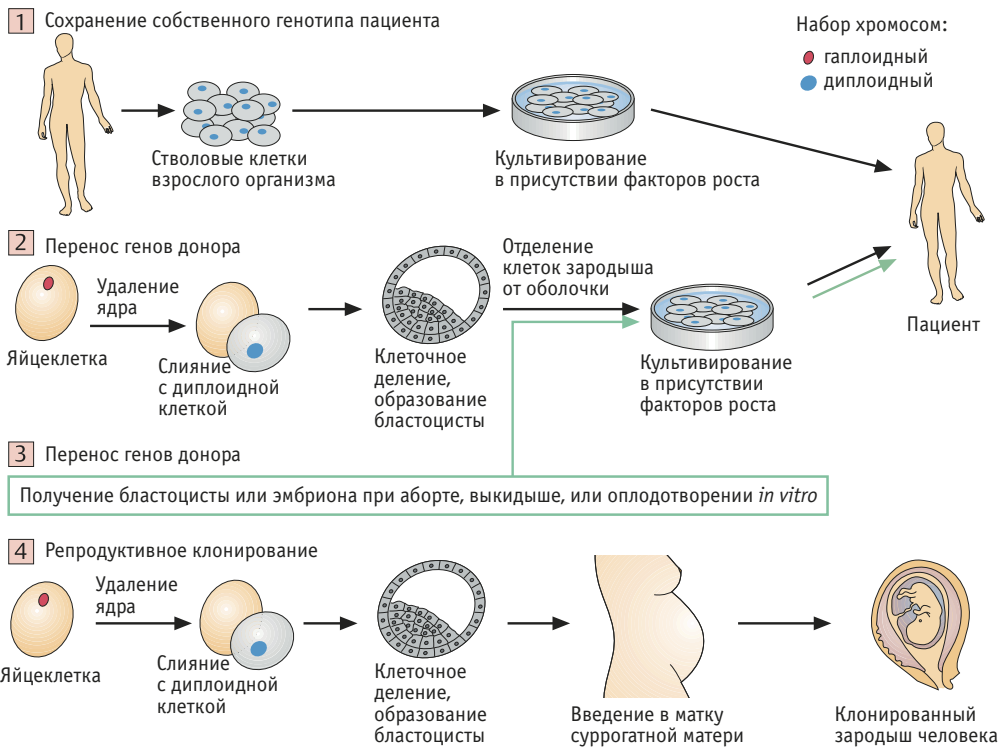
ПРИМЕНЕНИЕ. Эмбриональные стволовые клетки применяются при изучении молекулярных механизмов развития организма и причин патологий, например врожденных дефектов, онкологических болезней и других. Другой пример использования эмбриональных стволовых клеток – создание коллекции клеточных культур различных линий с целью изучения действия новых лекарственных препаратов на ткани организма. Наконец, третье перспективное направление – клеточная терапия хронических заболеваний: в частности трансплантация клеток островков поджелудочной железы, полученных из стволовых клеток, могла бы помочь детям с диабетом I типа. Несмотря на эти многообещающие перспективы, здесь важно обратить внимание на возможные проблемы: например, правильная дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в культуре и иммуносовместимость.

ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ. Является ли зародыш на стадии морулы или бластоцисты человеком, и имеет ли он наравне со всеми гражданами юридическое право на жизнь? Эти и другие вопросы, связанные с этической стороной использования эмбриональных стволовых клеток, активно обсуждаются. В настоящее время в большинстве промышленно развитых стран сохраняется ограничение на терапевтическое клонирование.

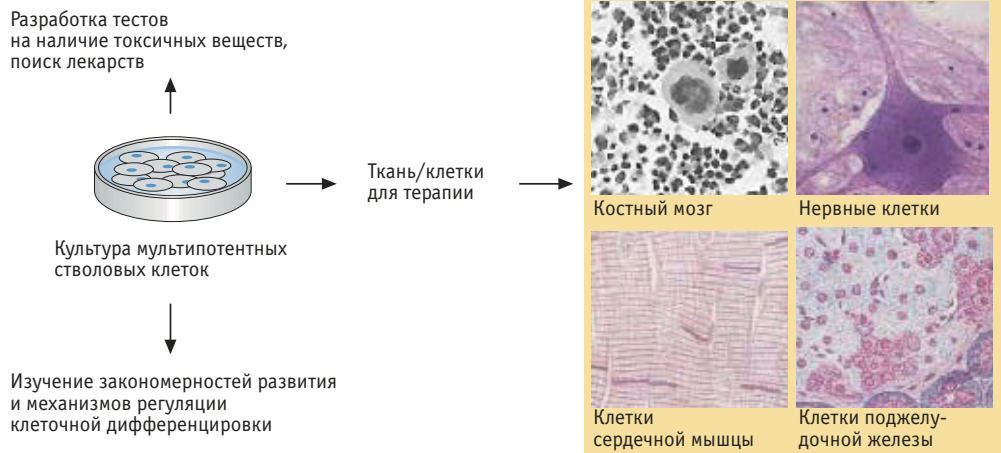
Схема развития человеческого эмбриона



Терапевтическое и репродуктивное клонирование



Терапевтическое значение стволовых клеток



Тканевая инженерия

ВВЕДЕНИЕ. Методы тканевой инженерии позволяют заменять поврежденные ткани путем трансплантации. Ранее существующая технология пересадки тканей при их повреждении (например, при ожогах) за последнее десятилетие была существенно усовершенствована благодаря появлению возможности использовать искусственно выращенные ткани целых органов: костей, хрящей, роговицы глаза, мышц, кровеносных сосудов, печени и нервных клеток. Большую роль в этом достижении сыграли биосовместимые материалы подложки и методики работы со стволовыми клетками.

ХИРУРГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ. Путем *ауто трансплантации* осуществляют пересадку тканей в пределах организма одного пациента. Например, при анастомозировании суженные вены сердца замещают венами из ноги (около 150 000 случаев в Германии в 2003 г.). Такой подход, хотя и не сопровождается иммунологическим отторжением, является достаточно дорогостоящим и зачастую болезненным. При *аллогенной трансплантации* пересаживают ткани или органы (сердце, нервы, печень, кости, поджелудочную железу и т. д.) от другого донора, в том числе умершего. Развитию этой технологии способствовала разработка иммуносупрессоров (в Германии в 2003 г. провели 2111 пересадок нервов, 772 — печени и 374 — сердца). Ученые прогнозируют широкое использование в хирургии искусственных биосовместимых материалов, например, при трансплантации сердечных клапанов, искусственных бедренных и коленных суставов или имплантатов груди.

РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ, СВЯЗАННЫХ С МАТРИКСОМ. Внеклеточный матрикс (например, коллагеновая сеть в костной ткани) часто функционирует в организме как формообразующий элемент при росте клеток и определяет строение человеческого тела. Искусственные матриксы из керамики, коллагеновых трубочек, а также пленки, мембраны или микроскопические шарики могут выполнять ту же функцию. Они могут быть использованы как материал подложки, на которой клетки в присутствии соответствующих ростовых факторов формируют искусственную ткань (происходит «экспансия»), которая впоследствии может быть перенесена в организм пациента. Для формирования такой ткани уже разработаны эффективные методики, например CAD/CAM-метод создания сложных форм. Снабжение растущих клеток в непростой системе путем образования капилляров (ангиогенеза) до настоящего времени остается важной задачей.

ТРЕХМЕРНЫЕ КЛЕТочНЫЕ КУЛЬТУРЫ. Многие клетки-предшественники и первичные клетки при определенных условиях могут быть культивированы на одном матриксе, в результате чего формируются

комплексные эквиваленты тканей. Такое удается, например, при экспансии клеток кожного эпителия в присутствии кератоцитов с образованием искусственного эпидермиса. Трехмерный эквивалент кожи поддерживается благодаря тому, что фибробласты кожи с кератоцитами размножаются в матриксе коллагена.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. Плюрипотентные стволовые клетки человека — перспективные материалы для тканевой инженерии благодаря их способности дифференцироваться в различные клеточные линии в зависимости от соответствующего ростового фактора. Костный мозг взрослого организма уже давно используется как источник стволовых клеток с минимальными этическими ограничениями. Стволовые клетки также выделяют из пуповины новорожденных.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ. Искусственные ткани в настоящее время используются преимущественно для проведения фармацевтических и косметологических исследований. Так, трехмерные культуры тканей в исследованиях кожной переносимости используют как альтернативу экспериментам с животными. Кожу человека используют также для трансплантации. Например, препарат Dermagraft® представляет собой искусственно полученную кожную ткань из фибробластов человека на биосовместимом легко абсорбируемом матриксе. Препарат используют при трансплантационной терапии ожогов, при заживлении ран, при воспалительных процессах (диабетические поражения ног, венозные язвы, пролежни), а также если собственного кожного материала пациента оказывается недостаточно для ауто трансплантации. Костная и нервная ткани также могут быть искусственно получены и использованы для терапии.

Размножение клеток тканей

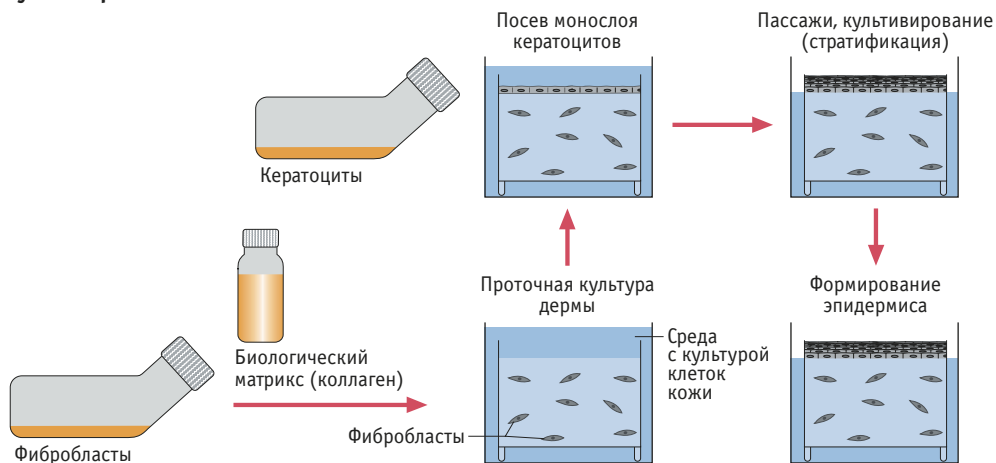
На основе стволовых клеток		Без употребления стволовых клеток	
кровеносные сосуды	сосуды печени	мочевой пузырь	мениск
хрящ	нервная ткань	хрящи уха, носа, суставов	слизистая оболочка полости рта
хрусталик	скелетные мышцы	сердечный клапан	слюнные железы
сердечная мышца	кожа	ткани кишечника	трахея
		ткань почки	мочеточник

В клинических или доклинических испытаниях

Коммерческое производство (выборочно)

США	Advanced Tissue Sciences	Органы и ткани человека, например кожа, хрящи, кости, печень
США	Curis	Заживление ран, регенеративная медицина
США	MatTek	Кожные пробы
Германия	BioTissue Technologies	Кожа, хрящи
Голландия	IsoTis	Кожа, хрящи, кости
Франция	SkinEthic Laboratories	Кожные пробы

Культивирование клеток кожи



Получение трансплантата

Стволовые клетки кости из костного мозга

Размножение («экспансия») в лабораторных условиях



Сорбция на частицах гидроксиапатита/фосфата кальция



Трансплантация к месту костного дефекта

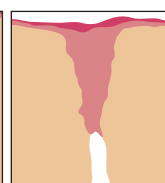
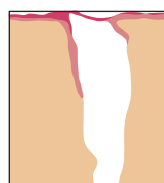
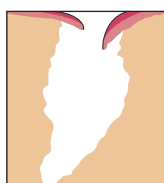
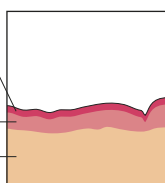


Восстановление кожи при помощи фибробластов

Заживление раны с помощью искусственной кожи

Ороговевший слой кератоцитов

Слой кератоцитов, способных к размножению



Интерфероны

ВВЕДЕНИЕ. Интерфероны (IFN) секретируются различными клетками иммунной системы и служат сигнальными веществами: иммунный ответ клетки обусловлен связыванием молекул интерферонов с INF-рецепторами. У млекопитающих выделяют интерфероны трех типов: IFN- α , IFN- β и IFN- γ . Эти молекулы вовлечены в регуляцию 20–30 генов и обладают широким спектром иммунорегуляторных, противовирусных и антипролиферативных (препятствующих делению клеток) свойств. Молекулы IFN- α и IFN- β стабильны при pH 5 и обладают сродством к одному и тому же рецептору (IFN-рецептор I типа). В отличие от IFN- α и IFN- β молекулы IFN- γ неустойчивы в кислой среде и связываются с рецепторами другого типа (IFN-рецептор II типа).

СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ. α -Интерфероны (IFN- α) образуются в лейкоцитах. Их гены составляют семейство из более 20 неаллельных генов, проявляющих высокую степень гомологии. Молекулярная масса этого полипептида –16 кДа, а гликозилированного до 26 кДа. В настоящее время IFN- α успешно применяют для лечения гепатитов В и С, а также некоторых злокачественных опухолей – рака мочевого пузыря, меланомы, лейкемии и лимфомы. Объем мирового рынка IFN- α в 2004 г. составил 3,2 млрд долл. США. Синтез β -интерферона (IFN- β) происходит в фибробластах. Полипептидная цепь IFN- β состоит из 166 аминокислотных остатков, а после гликозилирования ~20 кДа. IFN- β применяют при лечении рассеянного склероза. Объем рынка IFN- β достигает 1 млрд долл. США. Источником γ -интерферона служат активированные Т-лимфоциты. В свою очередь IFN- γ активирует макрофаги. Белковая цепь содержит 143 аминокислотных остатка, и в зависимости от степени гликозилирования имеет молекулярную массу 15–25 кДа. IFN- γ используют при лечении хронического гранулематоза. Объем рынка IFN- γ составляет ~200 млн долл. США. В настоящее время ведутся клинические испытания интерферонов в терапии злокачественных опухолей (IFN- α , - β и - γ), аутоиммунных заболеваний (IFN- α и - β), вирусных инфекций (IFN- α и - β), ревматоидного артрита и астмы (IFN- γ).

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИНТЕРФЕРОНОВ. Возможность терапевтического применения интерферонов обсуждалась давно, однако традиционный способ их получения путем фракционирования донорской крови оказался неприменим для производства лекарственных препаратов. Лишь в 1986 г. с помощью методов генетической инженерии удалось наладить промышленное производство препаратов интерферонов для клинического использования. Клонирование генов этих белков, содержащихся в крови в очень малых концентрациях, оказалось слож-

ной задачей, решение которой для IFN- α было найдено в 1982 г.. Процедура клонирования включала в себя следующие этапы. 1. Из лейкоцитов человека выделили мРНК, затем провели обратную транскрипцию и полученной кДНК трансформировали клетки *Escherichia coli*. Было получено 6000 клонов, которые разделили на группы. 2. Провели гибридизацию каждой группы клонов с неочищенным препаратом IFN- α -мРНК. 3. Осуществили трансляцию гибридных мРНК в бесклеточной системе и измерили противовирусную активность полученных белковых продуктов. 4. Провели экспрессию выбранных кДНК. Так как биологическая активность интерферона не зависит от степени его гликозилирования, для получения больших количеств белка часто используют клетки *E. coli*. В промышленных технологиях интерферонов используются и другие хозяева: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, культуры животных клеток или молоко трансгенных животных.

ПОЛУЧЕНИЕ. В промышленности IFN- α начали получать с 1978 г. В качестве источника IFN- α использовали клетки лимфобластомы человека, индуцированные вирусом Сендай (клеточная линия Nawalma), в которых синтезировались по меньшей мере восемь различных изоформ IFN- α . В настоящее время почти все интерфероны получают из клеток рекомбинантных штаммов *E. coli*. Исключение – IFN- β 1а, который получают из рекомбинантных клеток CHO. В клетках *E. coli* удается получать высокий выход продукта, затем белок очищают методами хроматографии. Так, фирма Roche производит интерферон- α 2а (Roferon A®) в рекомбинантных клетках *E. coli* K12. После выращивания клетки разрушают методом низкотемпературного замораживания, удаляют клеточные фрагменты центрифугированием, а белок очищают хроматографическими методами.

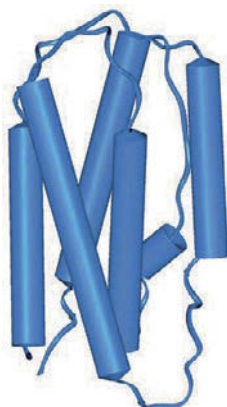
Препараты интерферонов, допущенные к применению

Интерферон	Назначение	Фирма-производитель
ПЭГ-IFN- α	Гепатит В и С (ПЭГ: полиэтиленгликоль)	Roche, Schering-Plough
IFN- α 2b	Лейкоз, меланома, миелома	Biogen, Yamanouchi, Enzon
IFN- β	Карцинома горла/носа, вирусный энцефалит	Rentschler
IFN- β 1a	Рассеянный склероз	Biogen, Serono
IFN- β 1b	Рассеянный склероз	Berlex, Schering AG
IFN- γ 1a	Ревматоидный артрит	Rentschler
IFN- γ 1b	Хронический гранулематоз	Genentech, Boehringer-Ingelheim

IFN- β 1a производится с использованием культуры животных клеток CHO, остальные интерфероны синтезируются в рекомбинантных клетках *E. coli*



Структура молекулы IFN- α (IITF) человека по данным ЯМР



Структура молекулы IFN- β (IA4I) свиньи; рентгеноструктурный анализ, разрешение 0,28 нм



Структура молекулы IFN- γ (IDC9) человека. Рентгеноструктурный анализ, разрешение 0,3 нм

Получение

IFN- α 2a (Roche)

Клетки *E. coli*

Рекомбинантные штаммы, различные промоторы и сигнальные последовательности

Биореактор

Ферментация в среде с высоким содержанием клеток

Выделение

Выделение телец включения, методы обычной и иммунохроматографии

До 10 мг/л после 24 ч ферментации, реализация с ПЭГ

IFN- γ 1b (Boehringer-Ingelheim)

Культура клеток CHO

Промотор SV40

Биореактор

Суспензия культуры

Выделение

4–5 хроматографических разделений

До 1 мг/л жидкой культуры

IFN- γ

Трансгенные козы

Вектор, несущий промотор β -лактоглобулина и ген IFN- γ человека

До 500 мг/л молока

Контроль качества продукта

Иммуный анализ, пептидное картирование, НДС-ПЭГ-электрофорез, обращенно-фазовая ВЭЖХ, спектрофотометрический анализ, масс-спектрометрия MALDI-TOF, проверка биологической активности

Интерлейкины

ВВЕДЕНИЕ. Интерлейкины (IL) – сигнальные вещества, которые вырабатываются одними клетками иммунной системы и служат для регуляции активности других клеток. Поэтому их часто называют «гормонами иммунной системы». У человека охарактеризованы более 20 типов интерлейкинов (IL-1–IL-23). Из них IL-2 уже применяется в медицине, а другие интерлейкины находятся на стадии исследования.

СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ. Интерлейкин-1 существует в двух формах (IL-1 α и IL-1 β). Он синтезируется фагоцитирующими клетками иммунной системы (макрофагами и моноцитами) в виде предшественника (молекулярная масса 31 кДа), который в результате протеолитического расщепления превращается в зрелую форму (молекулярная масса 17,5 кДа). Биологическая функция IL-1 заключается в стимуляции роста лимфоцитов, фибробластов, гематопоэтических клеток и тимоцитов. Обнаружены рецепторы IL-1 двух типов: рецепторы I типа находятся на поверхности T-клеток и фибробластов, а рецепторы II типа – на В-лимфоцитах. Вероятный механизм действия IL-1 следующий: после того как макрофаг встретился с антигеном и осуществил его протеолитическое расщепление, он начинает секретировать IL-1, который стимулирует пролиферацию и размножение клеток иммунной системы. На следующей стадии развития иммунного ответа решающая роль принадлежит IL-2 – так называемому «фактору роста T-клеток». IL-2 охарактеризован лучше других типов интерлейкинов. Он вырабатывается активированными T-клетками и стимулирует деление и рост T- и В-клеток. Активированные T-клетки секретируют IL-2, а также рецепторы, которые находятся на поверхности клеток, таким образом процесс пролиферации T-клеток может идти непрерывно. Другое действие IL-2 заключается в стимуляции клеток-киллеров (NK-клеток – от *англ.* natural killer) и моноцитов с помощью рецепторов IL-2 на поверхности этих клеток. В настоящее время уже получены рентгеноструктурные данные для IL-2 – гидрофильного гликопротеина, M_r 15,5 (133 аминокислотных остатка). В медицине IL-2 используют в терапии опухолей, в частности почечно-клеточного рака. IL-3 представляет собою гликопротеин, состоящий из 133 аминокислот. Он синтезируется активированными T-лимфоцитами и действует на плюрипотентные стволовые клетки в костном мозге, стимулируя созревание лимфоцитов (нейтрофилов и макрофагов) и других клеток-предшественников иммунной системы. По этой причине IL-3 еще называют мультипотентным колониестимулирующим фактором. Интерлейкин-4 (IL-4) – гликопротеин, M_r 20, который действует на В-клетки, активируя их дифференцировку с преимущественной продукцией IgG и IgE, а также способствует презентации антигенов моноцитами.

Действие интерлейкина-6 (IL-6) аналогично эффекту IL-1 и IL-2, кроме того, он активирует экспрессию различных белков (так называемых белков острой фазы) в гематоцитах и, вероятно, задействован в развитии аутоиммунных заболеваний. Интерлейкин-10 (IL-10) является ингибитором синтеза других цитокинов. Интерлейкин-12 (IL-12) стимулирует синтез γ -интерферона T-лимфоцитами и NK-клетками и, как предполагают, играет важную роль в осуществлении и регуляции иммунного ответа. Подавляющее большинство исследований, направленных на изучение возможности терапевтического применения рекомбинантных интерлейкинов, связано с терапией рака. Кроме того, интерлейкины могли бы применяться для заживления ран, активации иммунитета у больных СПИДом и супрессии иммунной системы при трансплантации костного мозга и развитие многочисленных антагонистов интерлейкинов.

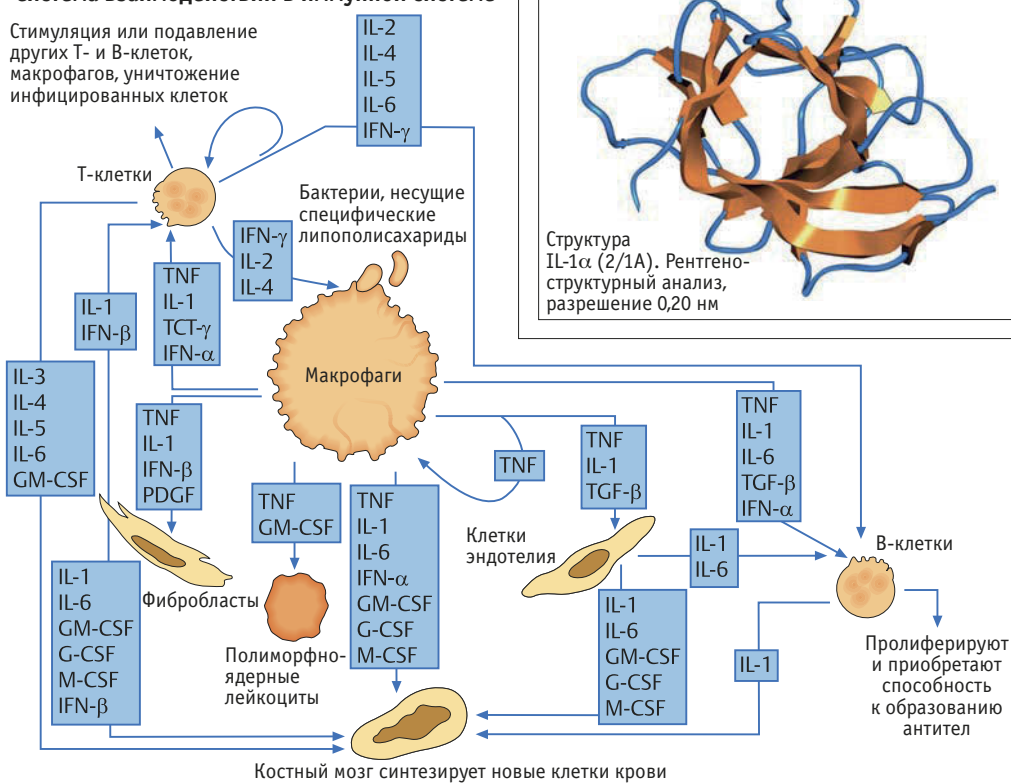
ПОЛУЧЕНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ. Для осуществления биологической функции IL-2 и для медицинских целей неважно, гликозилирован белок или нет, поэтому рекомбинантный IL-2 получают из клеток *Escherichia coli*. В культурах со средней или повышенной плотностью клеток значительная часть экспрессированного белка оказывается в составе телец включения, которые сначала очищают методом гель-хроматографии, затем солибилизируют в восстанавливающих условиях, а потом белок осаждают в окислительных условиях. Дальнейшую очистку проводят методом ВЭЖХ, осаждением и гель-фильтрацией. Активность определяют по включению H^3 -меченого тимидина в IL-2-зависимые T-клетки мыши и развитию многочисленных антагонистов интерлейкинов.

Интерлейкины

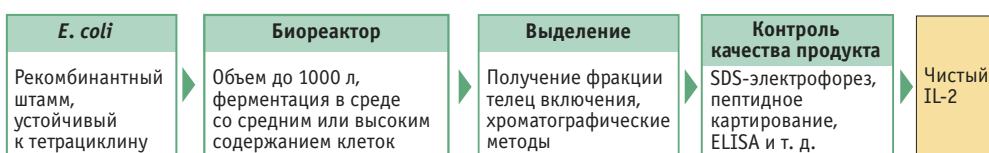
	Клиническое применение	Производитель	Фаза испытаний
IL-1	Гематопоз	Roche/Immunex	Допущен к применению
IL-1R	Астма	Immunex	Допущен к применению
IL-1RA	Ревматоидный артрит	Amgen	Допущен к применению
IL-2PEG	ВИЧ	Chiron	Допущен к применению
IL-2	Рак почек	Chiron	Допущен к применению
IL-3	Трансплантация стволовых клеток	Sandoz	Фаза III
IL-4	Рак легких	Schering-Plough	Фаза II
IL-6	Тромбоцитопения	Serono	Фаза I/II
IL-8RA	Воспалительные процессы	Repligen	Последние стадии клинических испытаний
IL-10	Злокачественные опухоли, аутоиммунные заболевания	Schering-Plough	Последние стадии клинических испытаний
IL-11	Тромбоцитопения	Genetics Institute, Schering-Plough	Фаза III
IL-12	ВИЧ, карциномы	Genetics Institute, Wyeth-Ayerst	Фаза I/II
IL-15	Инфекционные болезни, мукозит	Immunex	Последние стадии клинических испытаний

Система взаимодействий в иммунной системе

Стимуляция или подавление других Т- и В-клеток, макрофагов, уничтожение инфицированных клеток



Получение IL-2



Эритропоэтин и другие факторы роста

ВВЕДЕНИЕ. Развитие техники работы с культурами клеток привело к обнаружению большого числа факторов роста (*colony stimulating factors*, CSF, колониестимулирующие факторы), которые стимулировали рост клеток в результате взаимодействия с рецепторами на клеточной поверхности. Эти факторы представляют собой цитокины — вещества, которые синтезируются клетками в очень малых количествах. Методами генетической инженерии можно получать их в необходимых количествах с целью изучения свойств, природы и механизма взаимодействия, а также возможностей терапевтического применения: особый интерес представляет направленное влияние на рост определенных типов клеток (клеток кожи, нервных клеток, эритроцитов, клеток костей и т.д.). Так, эритропоэтин, фактор роста гранулоцитов (G-CSF) и фактор роста гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) уже успешно применяются в медицине. Эритропоэтин стимулирует образование эритроцитов, G-CSF — нейтрофильных гранулоцитов, а GM-CSF — эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и макрофагов. Эти факторы назначают пациентам с анемией, которая часто возникает при проведении диализа. В Германии около 40 000 пациентов принимают эритропоэтин и около 100 000 — GM-CSF. Мировой объем рынка эритропоэтина составляет около 10 млрд долл. США, G-CSF и GM-CSF — около 3 млрд долл. США (2004 г.).

ЭРИТРОПОЭТИН (EPO) — фактор роста эритроцитов. Интенсивность биосинтеза эритропоэтина в клетках эндотелия почек и клетках Купфера в печени зависит от парциального давления кислорода в крови. Под действием EPO гематопозитические стволовые клетки костного мозга теряют ядра, и в них начинается синтез гемоглобина: так происходит созревание эритроцитов. Таким образом, EPO стимулирует обновление клеток крови, и поэтому он используется при лечении малокровия, развивающегося у пациентов, которым проводят диализ крови (искусственная почка). В последнее время наряду с эритропоэтином при лечении таких пациентов успешно используется комбинированный препарат: факторы роста GM-CSF или G-CSF, факторы роста гранулоцитов, макрофагов и моноцитов. Ген эритропоэтина из клеток костного мозга человека клонирован в 1984 г. Гликопротеин с молекулярной массой 34 кДа представляет собой полипептид из 165 аминокислотных остатков, который гликозилирован по трем атомам азота и одному атому кислорода. На углеводные цепи приходится около 40% молекулярной массы этого гликопротеина и они, по-видимому, имеют важное функциональное значение. По этой причине поиск клеток-хозяев для экспрессии биологически активного эритропоэтина оказался чрезвычайно сложной задачей. Высокий выход функционального гликопротеина был получен в клет-

ках CHO. Кристаллическая структура эритропоэтина, связанного с внеклеточными доменами его рецепторов, представлена в таблице.

ФАКТОРЫ РОСТА. Гликопротеины, входящие в состав большой группы факторов роста, специфически стимулируют размножение и созревание клеток соединительной ткани, а также нервных, костных и других клеток. К настоящему времени гены многих факторов роста клонированы, и некоторые рекомбинантные белки уже применяются в медицине или находятся на стадии клинических испытаний. Препараты, полученные на основе этих белков, используют для лечения невропатий, остеопороза и язвенной болезни. Исследуется возможность применения фактора роста эпителия для заживления ран, в том числе после удаления катаракты. Были получены трансгенные овцы, в которых активность фактора роста эпителия увеличена по сравнению с нормой, в результате рост шерсти у таких овец значительно усилился.

ПОЛУЧЕНИЕ. Эритропоэтин получают в биореакторах объемом до 1000 л с использованием культуры животных клеток, прежде всего — рекомбинантных CHO-клеток (клетки яичника китайского хомяка). Необходимость использования животных клеток для получения эритропоэтина связана с тем, что биологически активный белок должен быть гликозилирован. Процесс ферментации продолжается 30 сут, после чего рекомбинантный белок подвергают четырехстадийной хроматографической очистке. Физиологическое действие других факторов роста не зависит от того, гликозилированы они или нет, поэтому в качестве клеток-хозяев для получения таких рекомбинантных белков используют микроорганизмы. Так, GM-CSF и G-CSF получают в клетках рекомбинантных штаммов *E. coli*.

Факторы роста

Фактор роста	Тип белка	Фирма-производитель	Применение	Фаза испытаний
Эритропоэтин	Гликопротеин, 34 кДа	Amgen, Roche	Анемия после диализа или химиотерапии	Допущен к применению
Гранулоцитарный и макрофагальный CSF	Гликопротеин, 18–30 кДа	Immunex	Инфекционные заболевания	Допущен к применению
Гранулоцитарный CSF	Гликопротеин, ~ 20 кДа	Amgen	Инфекционные заболевания	Допущен к применению
Морфогенетический белок кости*	Гомодимер, 26 кДа	Wyck	Заболевания кости и хряща, трансплантация костного мозга	Допущен к применению
Фактор роста кровяных пластинок		Chiron	Заживление ран, диабетическая язва	Допущен к применению
Фактор роста нервов		Genetech, Amgen	Болезнь Паркинсона	Допущен к применению
Фактор роста эпидермиса		Johnson & Johnson, Landmark Co.	Заживление ран, катаракта, стрижка овец	Допущен к применению
Фактор роста фибробластов		Scios Nova	Заболевания соединительной ткани	Допущен к применению

* Белок, превращающий циркулирующие в крови стромальные клетки в клетки костной ткани. – *Прим. перев.*
CSF – колониестимулирующий фактор. GF – фактор роста

Выделение факторов роста



В качестве источника факторов роста используют лейкоциты



На культуру лейкоцитов наслаивают культуру исследуемых клеток



При наличии фактора роста, специфического для определенного типа клеток, происходит стимуляция роста этих клеток

Трансгенная овца с активированным фактором роста эпителия BioSlip

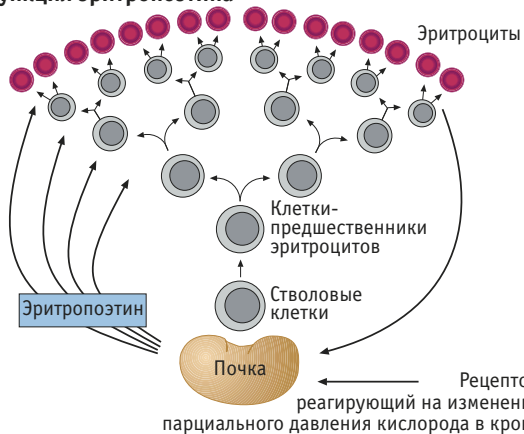


EPO



Эритропоэтин в комплексе с внеклеточными доменами EPO-рецепторов. Зеленым цветом показаны рецепторы, синим – молекула эритропоэтина. ICN4, разрешение 28 нм

Функция эритропоэтина



Эритропоэтин и GM-CSF: получение и очистка

EPO	Рекомбинантные клетки CHO	Биореактор	Очистка
GM-CSF	Рекомбинантные клетки <i>E. coli</i>	Биореактор	Очистка
Контроль качества продукта	Иммуный анализ, составление пептидных карт, НДС-ПААГ-электрофорез, обращенно-фазовая ВЭЖХ, масс-спектроскопия MALDI-TOF, проверка биологической активности		

Другие белки, имеющие медицинское значение

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время ведутся исследования возможностей медицинского использования более чем 300 рекомбинантных белков. Здесь будут рассмотрены цитокин (фактор некроза опухолей (TNF)), ДНКазы I и глюкоцереброзидаза.

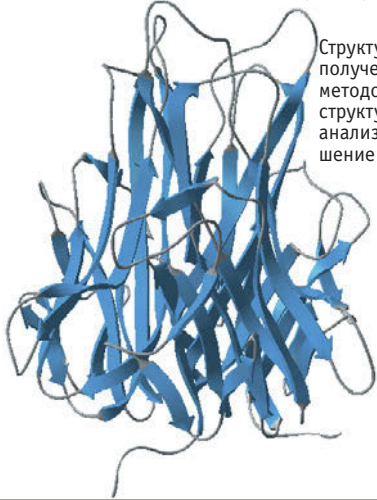
ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ (TNF). Фактор некроза опухолей был обнаружен в результате наблюдения, что при бактериальной инфекции происходит замедление развития некоторых опухолей. Под действием бактериального эндотоксина, имеющего структуру липополисахарида, в активированных макрофагах, моноцитах, клетках-киллерах (NK-клетках), а также в клетках мозга и печени образуется фактор некроза опухолей. Существует два варианта TNF; их аминокислотные последовательности гомологичны лишь на 30%, однако эти гликопротеины проявляют сходные биологические свойства. TNF α (M_r 17,3, 157 аминокислотных остатков) вырабатывается макрофагами. Рентгеноструктурный анализ молекулы TNF α выявил необычно высокое содержание β -складчатых слоев. Для TNF α обнаружены рецепторы двух типов. TNF β (171 аминокислотный остаток) синтезируется в лимфоцитах (поэтому его иногда называют лимфотоксином) и связывается с теми же рецепторами, что и TNF α . Структура TNF β мало изучена, поскольку большинство исследований были сосредоточены на TNF α . Было показано, что в системе *in vitro* TNF α обладает цитотоксическим действием по отношению к трансформированным клеткам, и это действие может быть усилено добавлением интерферона. Клинические испытания в системе *in vivo* не подтвердили эти наблюдения, и, кроме того, выявили опасные побочные эффекты (воспалительные реакции, артрит, повышенное артериальное давление и др.). TNF α играет важную роль во многих «положительных» и «отрицательных» реакциях, происходящих в организме: он определяет состояние септического шока и кахексию (истощение) в результате хронических инфекций или развития опухоли. TNF α также вовлечен в регуляцию образования других цитокинов и, вероятно, участвует в развитии аутоиммунных заболеваний (в частности, ревматоидного артрита) и отторжении трансплантата. Такое интересное «неоднозначное» действие TNF, а также возможность его получения в качестве рекомбинантного продукта (например, в клетках *E. coli*) послужили причиной активного изучения этого фактора.

ДНКАЗА I (Pulmozyme®). Муковисцидоз – наследственное заболевание, в большинстве случаев с летальным исходом, связанное с накоплением в легких слизи, затрудняющей дыхание. Повышенная вязкость слизи обусловлена присутствием внеклеточной ДНК из распадающихся лейкоцитов. Для лечения (ингаляции) используется рекомбинантная

ДНКазы I человека (260 аминокислотных остатков), синтезируемая в клетках CHO. Мировой объем рынка составляет около 300 млн долл. США (2004 г.). Выход рекомбинантного продукта в этих клетках удалось повысить благодаря экспрессии дигидрофолатредуктазы и присутствию в среде роста метотрексата. Активность природного фермента ингибируется G-актином, поэтому методами белковой инженерии был получен мутантный белок, устойчивый к действию актина, что повысило активность ДНКазы I в 10–50 раз. Применение ДНКазы I не излечивает пациентов, однако немного облегчает их состояние. Муковисцидоз – многогенное заболевание, и в последнее время ведется активное изучение возможностей генной терапии.

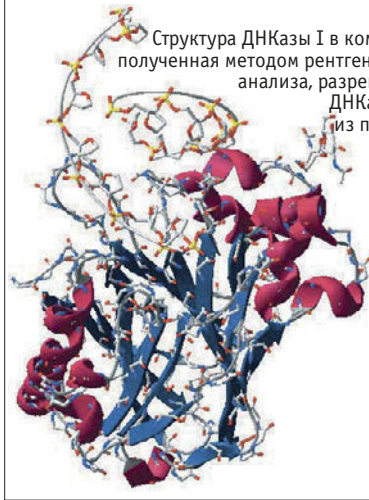
ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗА. Болезнь Гоше – наследственное заболевание, причиной которого является накопление глюкоцереброзидов в некоторых клетках в результате пониженного содержания глюкоцереброзидазы (Cerezyme™). В зависимости от клинических симптомов различают три варианта протекания болезни. Наиболее тяжелая форма I характеризуется болями в костях и отделах пищеварительного тракта. Эти симптомы могут быть сглажены при регулярном внутривенном введении глюкоцереброзидазы. Глюкоцереброзидазу человека получают из плаценты или в виде рекомбинантного продукта, образующегося в клетках CHO. Мировой объем рынка составляет около 850 млн долл. США (2004 г.).

Фактор некроза опухолей (TNF α)



Структура (1A8M), полученная методом рентгеноструктурного анализа, разрешение 0,23 нм

ДНКаза I



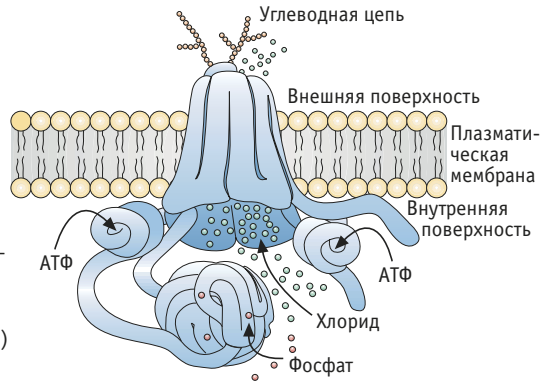
Структура ДНКазы I в комплексе с ДНК, полученная методом рентгеноструктурного анализа, разрешение 0,28 нм. ДНКаза I выделена из поджелудочной железы быка

Муковисцидоз

Сниженный уровень выделения хлоридов через эпителиальные клетки, образование слизи в легких; среди индо-европейской группы населения: 1 на 2000 новорожденных, 1 на 25 гетерозиготных носителей; продолжительность жизни менее 30 лет

Лечение: препараты рекомбинантной или природной ДНКазы I человека в виде аэрозоля

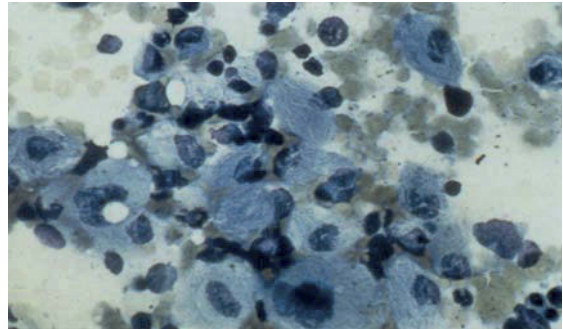
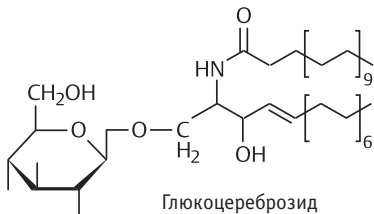
Трансмембранный регулятор муковисцидоза (CFTR) – трансмембранный белок, построенный из 2170 аминокислотных остатков и закодированный на 7-й хромосоме (7q31) человека. Наиболее часто встречающейся мутацией (70% случаев заболевания) является делеция Phe⁵⁰⁸ (AF508)



Болезнь Гоше

Дефект фермента β -глюкоцереброзидазы (ген расположен на хромосоме 1) приводит к заболеваниям крови, разрастанию легочной ткани, поражению костной и нервной ткани

Лечение препаратами природной или рекомбинантной глюкоцереброзидазы



Мазок костного мозга с окрашенными макрофагами (голубые), форма которых характерна для лизосомального нарушения при болезни Гоше

Клетки CHO

Введение в клетки плазмиды pGB20, в которую встроен ген β -глюкоцереброзидазы (1191 п.н.)

Реактор

Объем до 2000 л

Очистка рекомбинантного продукта

Ультрафильтрация, хроматография

Ферментативная обработка

Частичное отщепление углеводных цепей

Вакцины

ВВЕДЕНИЕ. При так называемой «пассивной иммунизации» в организме вырабатываются антитела к вирусам, бактериям или токсинам. «Активная иммунизация», то есть вакцинация, которая используется человеком уже более 200 лет, является значительно более эффективным способом стимуляции иммунной системы. В ответ на введение вакцины в организме происходят следующие процессы: активируются В-лимфоциты – продуценты антител; активируются Т-лимфоциты, которые обладают способностью уничтожать чужеродный антиген; образуются долгоживущие В- и Т-лимфоциты (клетки памяти), которые быстро активизируются при следующей встрече с тем же антигеном. В качестве вакцины могут служить инактивированные, либо ослабленные (аттенуированные) микроорганизмы, которые не являются вирулентными, однако вызывают иммунную реакцию. Иммунный ответ вызывают не только целые клетки, но и отдельные клеточные компоненты, например полисахариды, а также токсичные белки (токсины). Для получения аттенуированных вирусов разработан целый ряд специальных технологий. На протяжении многих лет вакцины применяются для профилактики таких заболеваний человека, как корь, дифтерия, столбняк, коклюш, туберкулез, холера и полиомиелит, а также ящур скота. К сожалению, существует множество заболеваний, против которых до сих пор не получено вакцин. К таким заболеваниям относятся многие тропические болезни и СПИД. Кроме того, снова становится актуальной профилактика некоторых болезней, которые уже считались побежденными, как, например, туберкулез. В значительной мере риск заболевания туберкулезом обусловлен появлением новых штаммов, обладающих устойчивостью к антибиотикам. Методы генетической инженерии позволяют получать новые высокоэффективные вакцины.

ПОЛУЧЕНИЕ ВАКЦИН. Традиционные методы производства вакцин основаны на получении инактивированных или ослабленных антигенов в форме, доступной для парентерального, внутримышечного или перорального применения. В качестве вакцины используют, как правило, непатогенные штаммы, которые, однако, вызывают иммунный ответ. Для получения такой формы штамма клетки выращивают в лабораторных условиях, а затем инактивируют, обрабатывая формальдегидом или подвергая тепловой обработке. Производство многих вакцин против микроорганизмов или их токсинов осуществляется путем ферментации в биореакторах. До 1970 г. для культивирования вирусов использовали яйца кур, а в качестве вакцины применяли белки вирусной оболочки. По современной технологии культуры животных клеток в биореакторах заражают вирусом. Затем выделенные из культуры клеток вирусы инак-

тивируют формальдегидом или тепловой обработкой. В связи с риском инфицирования все этапы производства вакцин требуют строжайшего соблюдения техники безопасности. После получения новых препаратов вакцин следует стадия испытаний на экспериментальных животных.

ПРИМЕРЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИН. Причиной столбняка является попадание в кровь нейротоксина, вырабатываемого бактериями *Clostridium tetani*. Для получения этого токсина разработан специальный штамм-суперпродуцент токсина (штамм Харварда). В ферментере по окончании роста культуры клетки подвергаются автолизу, освобождаются от клеточных фрагментов фильтрованием, а токсин подвергают обработке 0,5%-м формальдегидом в течение четырех недель. Полученный белок называется токсоидом. Его очищают диалитрацией и высаливанием, для повышения иммуногенности осаждают на солях алюминия, после чего проводят испытания на экспериментальных животных. Вакцину против кори получают, заражая культуру клеток животных или человека вирусом *rubella* с пониженной вирулентностью (штамм Эдмонтона). После лизиса клеток-хозяев из среды выделяют вирус, который затем лиофилизируют для получения препарата с длительным сроком хранения.

Основные типы вакцин

Пассивная иммунизация

Введение антител

Активная иммунизация

- 1 Парентеральное или
- 2 Пероральное введение
 - убитых патогенных микроорганизмов
 - ослабленных патогенных микроорганизмов
 - патоген-специфического антигена
 - патоген-специфической ДНК
- 1 В случае системных инфекций
- 2 В случае локальных инфекций

Возникновение эпидемий инфекционных заболеваний

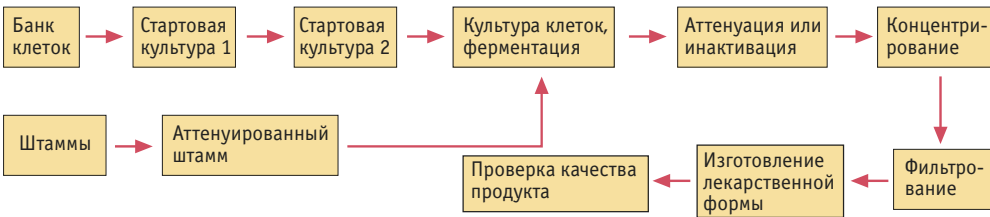
Заболевание	Количество зарегистрированных случаев заболевания, млн/год	Количество смертельных исходов, тыс./год
Диарея	> 4000	> 400
Гельминты	> 2000	>200
Болезни дыхательных путей	> 350	> 4000
Малярия	> 300	> 1
Шистосомоз	> 250	> 10
Корь (в тропических странах)	> 44	> 1000
Болезнь Шагаса (южно-американский трипаносомоз)	> 25	—
Туберкулез	> 6	> 2000
СПИД	> 5	> 150

Примеры часто используемых вакцин

Вакцина	Применение	Состав
1 BCG	Туберкулез	Содержит живые аттенуированные штаммы* <i>Mycobacterium bovis</i>
1 Rubella	Корь	Содержит живые аттенуированные вирусы <i>Rubella</i>
2 Poliomyelitis	Полиомиелит	Содержит живые аттенуированные вирусы полиомиелита
1 2 Cholera	Холера	Содержит убитые клетки <i>Vibrio cholerae</i>
2 Typhus	Тиф	Содержит живые аттенуированные штаммы <i>Salmonella typhimurium</i>
1 Haemophilus	Менингит	Содержит полисахарид капсулы <i>Haemophilus influenzae</i>
1 MKS	Ящур	Содержит инактивированный формалином вирус ящура

* Аттенуированный штамм – неvirulentный ослабленный штамм, который способен вызывать иммунный ответ

Производство противовирусной вакцины



Ферментация и выделение

Антибактериальные вакцины

Биореактор
Культивирование патогенных бактерий, например, в реакторе объемом 5000 л

Инактивация

Добавление формальдегида

Выделение и контроль качества продукта

Очистка хроматографическими методами. Тестирование на животных

Лиофилизированный, устойчивый при хранении токсид

Антивирусные вакцины

Получение

Аттенуированные вирусы в зародышах трансгенных кур или в культуре животных клеток

Лиофилизованная, устойчивая при хранении вакцина

Рекомбинантные вакцины

ВВЕДЕНИЕ. Методы генетической инженерии открывают новые возможности для создания вакцин. Наряду с получением чистых препаратов техника рекомбинантных белков позволяет разрабатывать совершенно новые концепции иммунизации, например введение вакцины в клетку с помощью белков оболочки непатогенных вирусов, экспрессия вакцины в трансгенных растениях или в молочных железах трансгенных животных, а также иммунизация путем трансфекции ДНК. В ветеринарии уже применяются рекомбинантные вакцины для животных, и уже допущена к применению рекомбинантная вакцина для профилактики гепатита В у человека, для профилактики дифтерии и вакцинирования против боррелиоза.

СТРАТЕГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ. Современные вакцины, полученные с использованием методов генетической инженерии, содержат, как правило, не целые клетки возбудителя заболевания, а их компоненты, например специфические поверхностные белки. Такой подход, несомненно, предполагает знание иммуногенной структуры патогена. Примером использования этого подхода является создание рекомбинантной вакцины против гепатита В. Гепатит В — эндемическое заболевание во многих странах азиатского региона. В 90% случаев заболевание проходит бессимптомно, но в 5% приводит к хроническим болезням печени. По оценкам, в мире почти 1 млрд носителей вируса гепатита В. Для получения рекомбинантной вакцины из плазмы инфицированных доноров выделили поверхностный антиген HBsAg вируса гепатита В и осуществили экспрессию в различных клетках-хозяевах: культурах *E. coli* клеток млекопитающих и *S. cerevisiae*, но предпочтительнее — в культуре пекарских дрожжей. Экспрессированный белок очищали хроматографическими методами. Иммунохроматографические методы с использованием антител к HBsAg хотя и дали хорошие результаты, но этот метод очень дорогостоящий. Другим направлением развития нового поколения вакцин является получение аттенуированных штаммов. Например, по такой технологии был создан новый штамм *Vibrio cholerae* для иммунизации против холеры. Холерный токсин, ответственный за патогенный эффект, представляет собой гексамерный белок с аденилатциклазной активностью. Под действием этого токсина концентрация цАМФ в тонком кишечнике увеличивается, что влечет значительные потери организмом жидкости и электролитов. Клиническими проявлениями холеры являются диарея и обезвоживание организма. Методами генетической инженерии удалось получить штамм *V. cholerae*, в геноме которого делетирован участок, ответственный за аденилатциклазную активность энтеротоксина. Такой измененный энтероток-

син вызывает полноценный иммунный ответ, однако не является патогенным. «Векторные» вакцины — еще одна новая стратегия иммунизации. В качестве вакцины при таком подходе используется вирусная ДНК, модифицированная таким образом, что она больше не оказывает патогенного действия, однако вызывает иммунный ответ. Для доставки вирусной ДНК в клетки выбран вирус коровьей оспы (*Vaccinia*). Геном этого вируса хорошо изучен, а сам вирус инфицирует клетки с высокой эффективностью и не опасен для человека. В геноме *Vaccinia* можно встраивать различные вирусные антигены и наблюдать иммунный ответ. Так, на экспериментальных животных было подтверждено действие такой системы с G-белком вируса бешенства, с поверхностным антигеном гепатита В, с NP- и HA-белками вируса гриппа и с различными гликопротеинами *Herpes simplex*. Стратегия «векторных» вакцин, несомненно, является многообещающей, однако ее серьезный недостаток заключается в риске развития вирусной инфекции у грудных детей, а также у лиц с ослабленным иммунитетом.

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ. Программы иммунизации, основанные на использовании трансгенных растений, больше всего обсуждаются в странах третьего мира. Такие «съедобные вакцины» поступают в организм пероральным путем, поэтому особое внимание уделяется тому, каким образом вакцина проходит через желудочно-кишечный тракт и насколько эффективен иммунный ответ клеток слизистой оболочки. Использование трансгенных растений для иммунизации не исключено в будущем, однако пока такой подход вызывает множество вопросов, в том числе касающихся условий созревания, хранения и переработки плодов трансгенных растений, несущих вакцину.

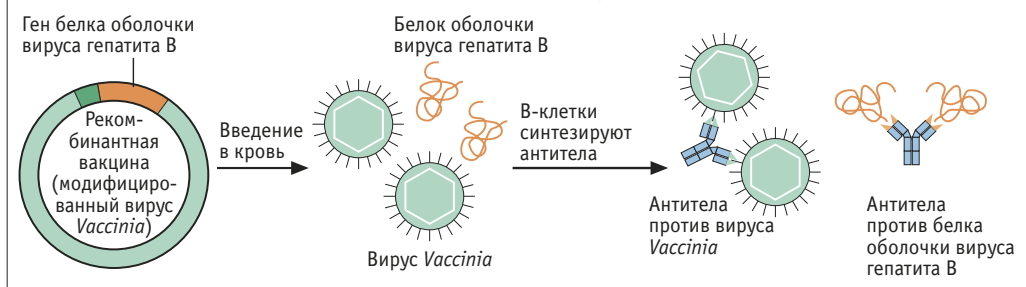
ДНК-ВАКЦИНЫ (ГЕННАЯ ИММУНИЗАЦИЯ). После инъекции ДНК, кодирующей поверхностный белок возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*, в селезенке мышей образовывались антитела к этому паразиту. Эксперименты на мышах по экспрессии фрагментов генома *Mycobacterium tuberculosis* подтвердили возникновение Т-клеточного иммунного ответа. Удалось также выделить гены, ответственные за возникновение такого иммунитета. В обоих случаях антиген-специфическую ДНК встраивали в плазмиды. В настоящее время ДНК-вакцины лишь начинают разрабатываться.

Примеры рекомбинантных вакцин

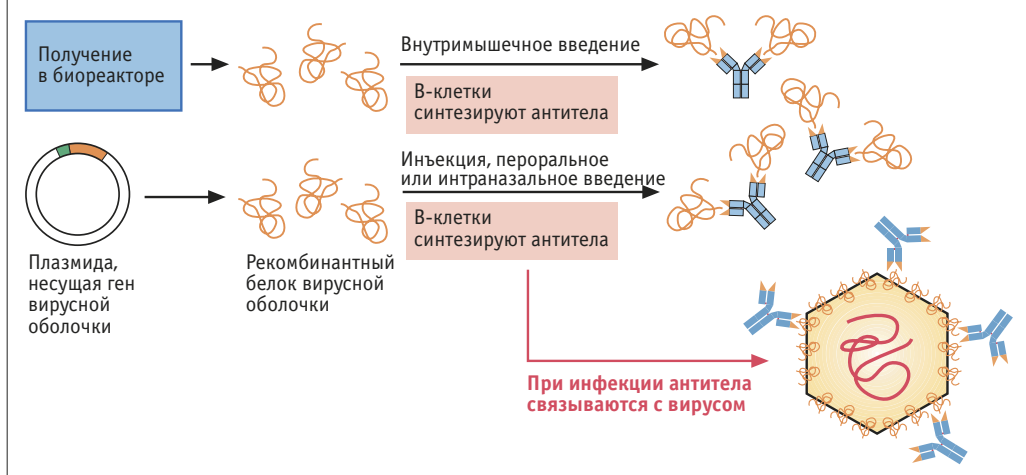
	Антиген	Фаза испытания	
Вирусы	Гепатит В	Поверхностный антиген	Допущена к применению
	Простой герпес типа 2	Поверхностный антиген	Клинические испытания
	Бешенство	Поверхностный антиген	Не допущена к применению
	Желтая лихорадка	Поверхностный антиген	Доклинические испытания
	СПИД	Поверхностный антиген	Клинические испытания
Бактерии	Различные стрептококки	Полисахариды, мембранные белки	Клинические испытания
	<i>Clostridium tetani</i>	Столбнячный токсин	Не допущена к применению
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Поверхностный антиген, ДНК*	Клинические испытания
Паразиты	<i>Plasmodium falciparum</i> /Малярия	ДНК*	Клинические испытания
	<i>Trypanosoma sp.</i> /Сонная болезнь	ДНК	Доклинические испытания
	<i>Schistosoma mansoni</i> /Шистосомоз	ДНК	Доклинические испытания

* Прайм-буст иммунизация

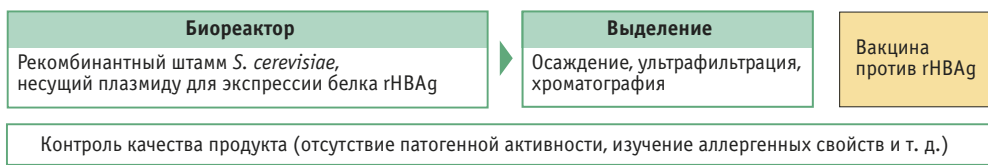
Рекомбинантная «векторная» вакцина на основе вируса *Vaccinia*



«Пептидные» или ДНК-вакцины против белков вирусной оболочки



Ферментация и выделение рекомбинантных вакцин против вируса гепатита В



Антитела

ВВЕДЕНИЕ. Антитела – это белки, обеспечивающие защитную функцию иммунной системы. Они циркулируют в крови и лимфе позвоночных животных. Антитела обладают способностью высокоспецифично связываться с антигеном, в качестве которого может выступать чужеродный белок, токсин, полисахарид или липосахарид оболочки вируса или патогенного микроорганизма. Образование специфических антител начинается при попадании антигена в организм; при аутоиммунных заболеваниях такая реакция провоцируется собственными белками. Даже низкомолекулярные соединения (гаптены), будучи связанными с подходящими носителями, могут вызывать образование специфических антител. Метод пассивной иммунизации основан на использовании антител в качестве вакцин против инфекции и отравления токсинами. Антитела также находят широкое применение в лабораторной практике: они служат для выявления специфических белковых продуктов. Очистка рекомбинантных антител в промышленности осуществляется иммунохроматографическими методами.

СТРУКТУРА АНТИТЕЛ. К антителам относятся иммуноглобулины. Иммуноглобулины человека по структуре и функциям принято делить на пять классов: IgG, IgM, IgA, IgE и IgD. IgG, преобладающий среди других иммуноглобулинов сыворотки крови, представляет собой тетрамер из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей, соединенных дисульфидными мостиками. В молекуле иммуноглобулина различают константные (структурные) (C_H , C_L) и переменные (V_H , V_L) домены. Иммуноглобулины расщепляются протеиназой папаином на два F_{ab} -фрагмента и один F_c -фрагмент. F_c -фрагмент (от англ. fragment crystallizable – способный кристаллизоваться) взаимодействует с рецепторами на клеточной поверхности, а F_{ab} -фрагмент (от англ. antigen binding fragment – связывающий антиген) связывает антиген. Антиген-связывающий фрагмент содержит участки, определяющие комплементарность антител к антигену (CDR – от англ. complementarity-determining regions). Эти участки называют гипервариабельными, так как они проявляют очень высокую изменчивость аминокислотной последовательности: 6 комплементарных областей построены из 20 аминокислот, следовательно, согласно комбинаторике, теоретически возможно $20^6 \times 20 = 20^{120}$ вариантов строения F_{ab} .

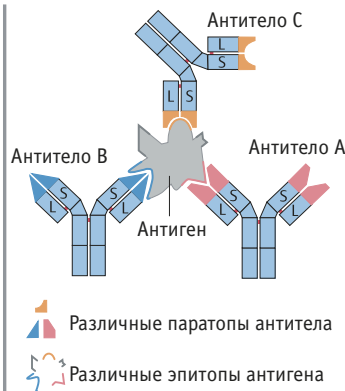
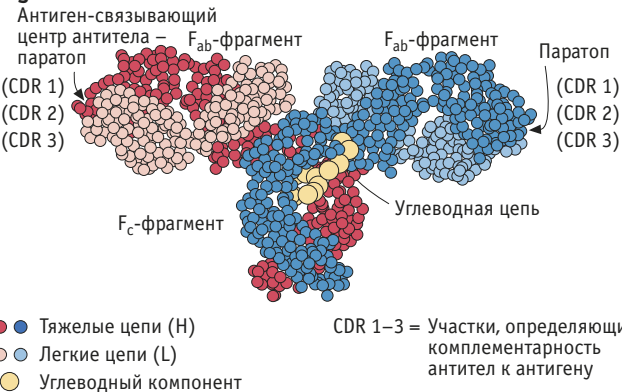
БИОСИНТЕЗ АНТИТЕЛ. Антитела синтезируются исключительно В-лимфоцитами. Огромное разнообразие антител обеспечивается благодаря тому, что для каждого типа цепей существует набор генных сегментов (в сумме их число превышает 1000), которые объединяются случайным образом в процессе рекомбинации. Кроме того, сам процесс рекомбинации при

образовании дочерних В-клеток оказывается не очень точным – часто происходят мутации (случайные выпадения или вставки нуклеотидов) в областях генов, кодирующих переменные участки иммуноглобулинов. Таким образом достигается большое разнообразие фенотипов иммуноглобулинов при сравнительно небольшом размере генома.

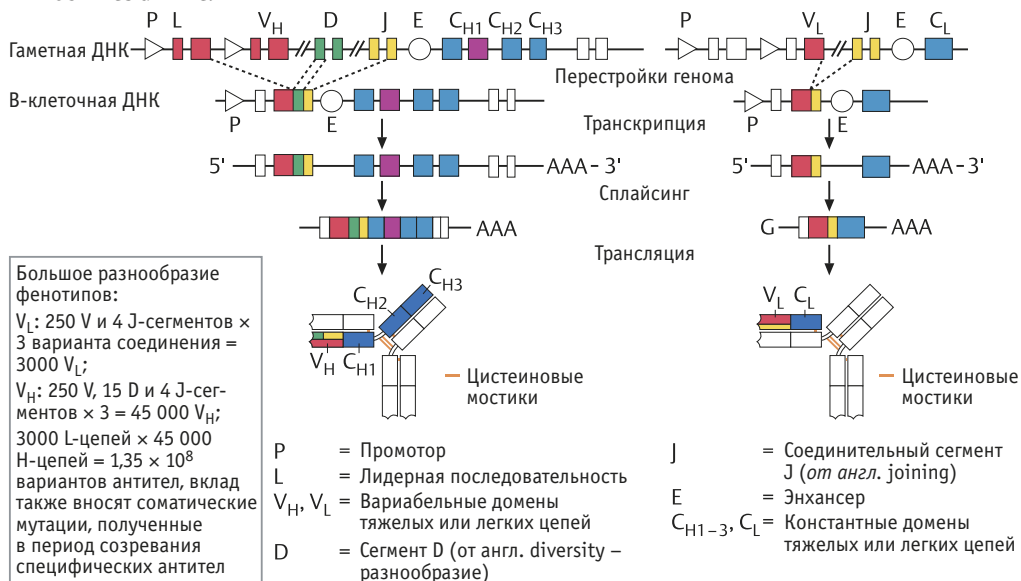
ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ. Поликлональные антитела – это смесь антител, образованных В-лимфоцитами в ответ на введение антигена. Различные антитела узнают различные части молекулы антигена (эпитопы), поэтому препарат поликлональных антител всегда в какой-то мере гетерогенный. Обычно антитела выделяют из обогащенной антителами сыворотки крови, которую получают путем многократного введения антигена животным (кролику, овце, козе, корове, лошади). Иммунизацию можно повторять через 1–2 недели, и из крупных животных (лошади, коровы или козы) удается получать значительные количества сыворотки. Антитела из сыворотки выделяют осаждением и хроматографически. Для повышения специфичности сыворотки к определенному антигену применяют методы аффинной хроматографии с иммобилизованным белком А из *Staphylococcus aureus*. Этот белок (M_R 42) с высокой специфичностью связывается с F_c -фрагментом IgG. Очищенный препарат IgG подвергают лиофилизации в стерильных условиях; его можно хранить в холодильнике в течение нескольких лет. Промышленное производство антител осуществляется в строгом соответствии с «Правилами организации производства и контроля качества лекарственных средств», принятыми Всемирной организацией здравоохранения.

РИСКИ. В организм антитела вводят парентерально (то есть в обход желудочно-кишечного тракта), так как в пищеварительном тракте они нестабильны. Антитела, полученные из животных, распознаются иммунной системой человека как чужеродные, поэтому при повторном введении возможно возникновение иммунной реакции. В медицине эту проблему решают частой сменой антител, полученных из различных животных. Альтернативой может быть использование антител, выделенных из крови доноров. Хотя в развитых странах существуют крупные банки донорской крови, где кровь доноров тщательно проверяется на наличие инфекционных агентов, все же риск заражения при использовании антител из крови доноров остается достаточно высоким.

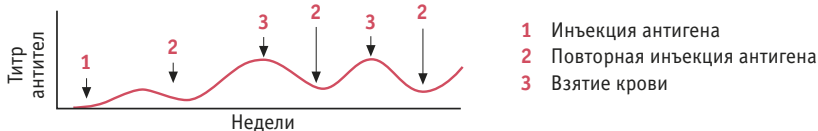
IgG



Биосинтез антител



Поликлональные антитела



Очистка хроматографическими методами

Несколько литров крови

Удаление клеток крови центрифугированием, получение плазмы

Фракция IgG

Осаждение этанолом или сульфатом аммония

Очистка

Хроматографическая очистка, аффинная хроматография с белком А

Коммерчески доступные антитела

Некоторые коммерчески доступные поликлональные антитела для пассивной иммунизации

Антитела	Источник
Против столбнячного токсина	Сыворотка лошади
Против возбудителя сонной болезни	Сыворотка лошади
Против вируса кори	Сыворотка человека
Иммуноглобулин G	Сыворотка человека

Моноклональные антитела

ВВЕДЕНИЕ. В отличие от поликлональных антител, которые представляют собой смесь различных антител, продуцируемых В-лимфоцитами в ответ на введение животному антигена, препараты моноклональных антител гомогенны. Для их получения используют гибридную технологию, то есть создают «бессмертную» линию клеток, продуцирующих антитела определенной специфичности.

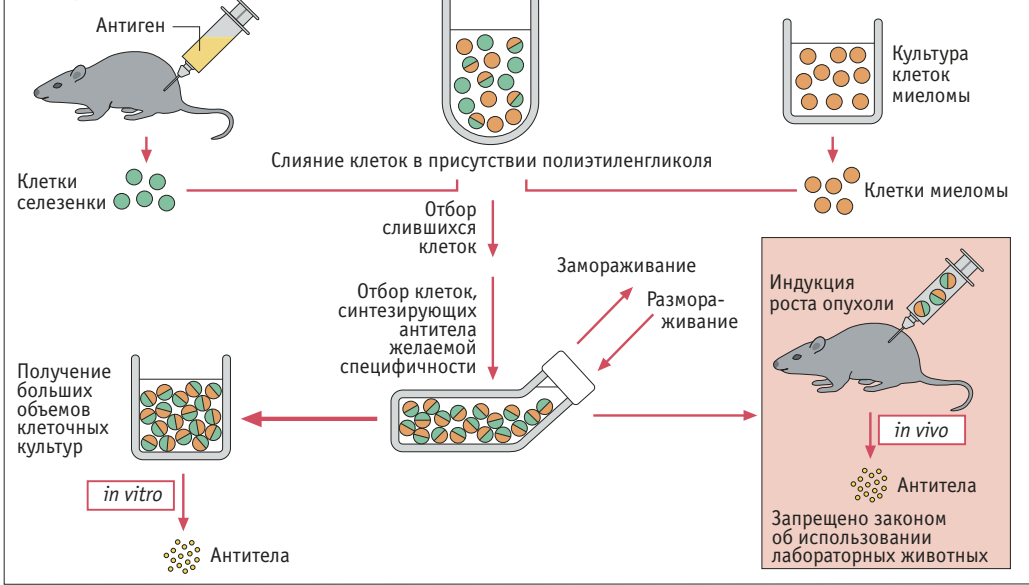
ТЕХНОЛОГИЯ ГИБРИДОМ. Животных (обычно мышей) иммунизируют антигеном. Когда в организме животного количество антител достигает высокого уровня, из селезенки выделяют лимфоциты. Затем осуществляют слияние этих клеток с клетками миеломной линии, которые обладают способностью к неограниченному росту. Часть полученных слитых клеток способны продуцировать антитела, как исходные лимфоциты, и обладают способностью к неограниченному росту, как клетки миеломы. Такие клетки удается выделить из смеси специальными иммунологическими методами селекции. Подходящие клоны замораживают при низкой температуре, и они сохраняют способность к образованию антител в течение многих лет.

ВЫДЕЛЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ. Клетки гибридомы обладают способностью к неограниченному росту. Их выращивают в культуре, а затем из культуральной жидкости выделяют моноклональные антитела (до 30 мг/л). В состав среды роста, кроме глюкозы и глутамина, входит сыворотка зародыша телят, богатая важнейшими цитокинами и другими веществами, необходимыми для роста (например, лактоферрином). В настоящее время широкое распространение получили сложные искусственные среды. Клетки гибридомы обычно растут в аэробных условиях на поверхности среды, однако их можно выращивать и в суспензии. Для их роста необходимо постоянное поступление в среду кислорода и CO_2 . В лабораторных условиях клетки гибридомы выращивают в медленно вращающихся емкостях. Для получения антител в промышленных масштабах используют биореакторы объемом до 10 м^3 (в основном реакторы с механическим перемешиванием или эрлифтные реакторы), в которых клетки гибридом культивируют на особых питательных средах с поддержанием постоянного уровня O_2 и CO_2 . В период разработки технологии ферментации гибридом клетки выращивали на носителях с большой площадью поверхности, например керамических носителях с крупными порами, что защищало их от механического повреждения, однако в настоящее время для промышленного получения антител, как правило, используют суспензии свободных клеток гибридом. Процесс ферментации осуществляется в периодическом или в непрерывном режиме, в последнем слу-

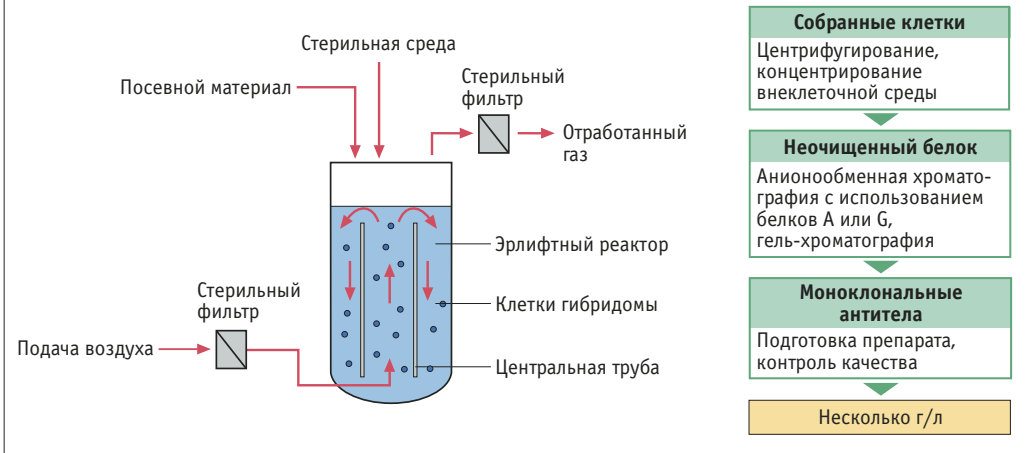
чае выход продукта может достигать нескольких граммов антител на литр культуры. Для концентрирования культуральной жидкости часто используют методы ультрафильтрации, после которой следует первичная очистка антител методом аффинной хромато-графии с белком А, а затем — тонкая очистка, включающая ионообменную и гель-хроматографию для удаления посторонних белков и агрегатов антител.

ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА. Медицинское применение мышинных моноклональных антител для лечения или диагностики заболеваний человека в системе *in vivo* влечет за собой риск возникновения иммунной реакции, так как антиген-связывающие участки антител мышей и человека могут значительно отличаться друг от друга. Иммунизация человека в экспериментальных целях невозможна по этическим соображениям, в то время как культивирование клеток миеломы человека является чрезвычайно сложной технической задачей. По этим причинам были разработаны другие методы получения антител: 1) в клеточных культурах лимфоцитов человека при добавлении в среду роста антигена и специфических факторов (таких как гормоны роста и цитокины) (иммунизация *in vitro*); 2) из селезенки иммунодефицитных мышей, которым введены лимфоциты человека; 3) получение рекомбинантных мышинных антител, несущих антиген-связывающие участки антител человека.

Получение моноклональных антител



Ферментация и очистка



Примеры применения моноклональных антител (некоторые препараты находятся на стадии испытаний)

Название	Применение	Белок-мишень/функция	Антитела
Различные	Диагностика	Гонадотропин, гормон роста, раковые эмбриональные антигены, герпес, <i>Legionella</i> и др.	Мышиные
Zenapax™	Трансплантация почек	Блокирует IL-2α-субъединицу	Человеческие
CEA-Scan™	Онкологические заболевания	Раковый эмбриональный антиген	Мышиные
Remicade™	Болезнь Крона	Блокирует TNF-альфа	Химерные
Omalizumab™	Аллергия, астма	Блокирует IgE	Человеческие
Apevive™	Псориаз	Антиген белка CD2 лимфоцитов	Фрагмент человеческих антител
Erbitux™, Avastin™	Рак кишечника	Блокирует рецепторы VEGF	Человеческие
Zevalin™, Rituxan™	Неходжкинская лимфома	Индукцирует лизис В-клеток	Химерные

Рекомбинантные и каталитические антитела

ВВЕДЕНИЕ. Методы генетической инженерии позволяют экспрессировать нативный или модифицированный ген антитела в различных клетках-хозяевах. В настоящее время в микроорганизмах получают только фрагменты антител, прежде всего одноцепочечные (*single-chain*) антитела или F_{ab} -фрагменты. Целые молекулы антител – иммуноглобулин IgG – удается экспрессировать в бакуловирусах, культурах эукариотических клеток, в молоке трансгенных животных, а также в трансгенных растениях (*plantibodies*). Рекомбинантные антитела могли бы найти широкое применение в медицинской диагностике. Биспецифические и бифункциональные антитела, связываясь с определенным антигеном, могут служить для доставки лекарственных веществ к клеткам-мишеням, например к опухолевым клеткам, или для иммуносупрессии. С помощью антител, полученных комбинаторными методами, удается идентифицировать и количественно описать огромное количество белков, выявленных на гелях после проведения двухмерного электрофореза или в белковых микрочипах. Каталитические антитела могут оказаться перспективными для биотрансформации.

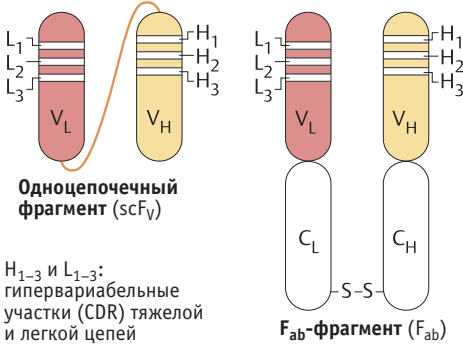
ПОЛУЧЕНИЕ. В качестве генетического материала может служить кДНК, полученная из иммунизированных лабораторных животных (чаще всего из лимфоцитов мышей), или из наивных В-лимфоцитов человека. Клонирование генов и их экспрессия в клетках-хозяевах позволяет получать белковые продукты – фрагменты антител. Например, для получения правильно свернутых одноцепочечных F_V - и F_{ab} -фрагментов в клетках *E. coli* кДНК, кодирующую V_L - и V_H -цепи, встроили в вектор на основе фага λ и трансформировали клетки *E. coli*. Продукт экспрессии – F_{ab} -фрагмент – секретировался в периплазматическое пространство клеток-хозяев. Для того чтобы полученные таким образом фрагменты выполняли свою биологическую функцию, необходим F_C -фрагмент; кроме того, C_H2 домен должен быть гликозилирован. По этой причине антитела для медицинских нужд, например бифункциональные антитела, как правило, получают в культурах животных клеток, в частности в клетках CHO. В настоящее время предпринимаются попытки получения антител в трансгенных растениях.

КОМБИНАТОРНЫЕ МОДИФИКАЦИИ. В отличие от метода гибридом создание комбинаторных библиотек позволяет получать весь спектр антител, образующихся в организме млекопитающих. Наибольшее распространение получил метод фагового дисплея (*phage-display*): из изолированных В-лимфоцитов выделяют мРНК и синтезируют кДНК, которую встраивают в экспрессирующий вектор на основе фага M13 таким образом, что полученные фрагменты ДНК,

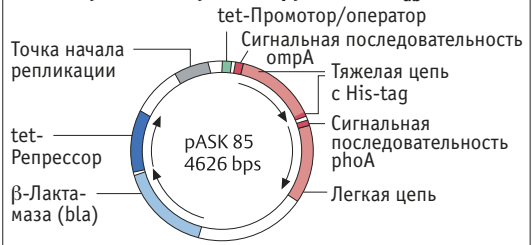
составляющие комбинаторную библиотеку кДНК одноцепочечных антител, присоединены к фаговому гену, кодирующему белок фаговой оболочки. В результате инфицирования клеток *E. coli* образуется до 10^{10} фагов-помощников, имеющих в своем геноме ген F_{ab} или одноцепочечного фрагмента scF_V и несущих на своей поверхности рекомбинантный белок. При отборе фагов, синтезирующих антитела с нужной специфичностью, используют иммунохроматографические методы. Повторное проведение мутагенеза с применением ПЦР или специальных «изменяемых» штаммов *E. coli* и последующий отбор позволяют получить антитела, обладающие высоким сродством к антигену. Так, многократный мутагенез участков CDR привел к повышению сродства фрагментов антител к гликопротеину оболочки вируса ВИЧ (gp120) в 420 раз по сравнению с исходным сродством. Этот подход уже успешно используется для получения высокоспецифичных антител человека: для этого составляются обширные библиотеки антител, представленных в В-лимфоцитах.

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА можно получать при иммунизации лабораторных животных веществом, которое является аналогом переходного состояния, образующегося в ходе ферментативной реакции. Другой метод – *phage-display*, позволяющий получать моноклональные или рекомбинантные антитела, которые в зависимости от выбора гаптана катализируют различные реакции, в том числе и те, что не происходят в естественных условиях. По данным рентгеноструктурного анализа участки CDR каталитических антител имеют сходство с активным центром фермента с аналогичной функцией. Так, в активном центре каталитического антитела 17E8, которое катализирует гидролиз формил-норлейцин-фенилового эфира, обнаружена диада серин–гистидин, а для всех сериновых гидролаз характерно присутствие в активном центре триады серин–гистидин–аспарагин/глутамин. Активность таких искусственных каталитических антител значительно ниже, чем у природных ферментов.

Фрагменты антител, полученные методами генетической инженерии



Вектор для экспрессии фрагмента F_{ab} в *E. coli*



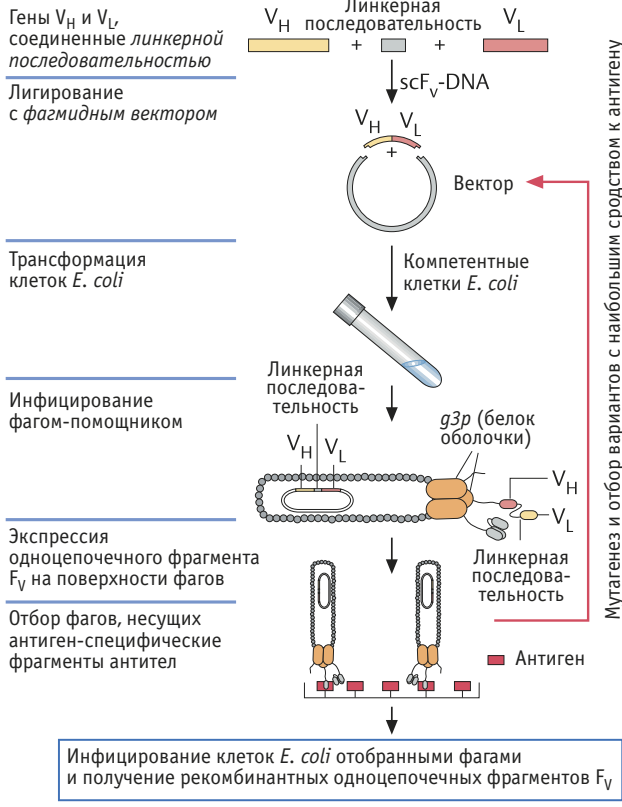
Бисистронная экспрессионная кассета (1 промотор для экспрессии двух цепей антитела)

ompA = белок А наружной мембраны
rhoA = лидерная последовательность щелочной фосфатазы
bla = устойчивость к ампициллину

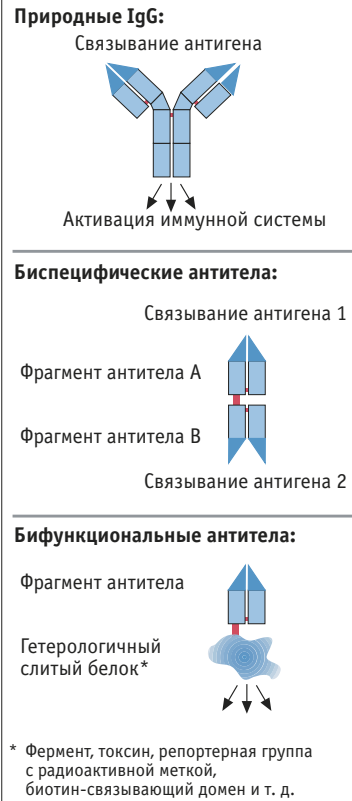
Разнообразие антител

Система	Количество	Клональная селекция	Повышение аффинности
В-лимфоциты (иммунная система)	> 10 ⁸ генов	Стимуляция специфических В-клеток с помощью поверхностных IgM	Лимфоциты: соматическая гипермутация
<i>E. coli</i>	Клонированные гены лимфоцитов, синтетические гены со «случайным» вариабельным участком (CDR). Всего > 10 ⁸ генов	Экспрессия фрагментов антител на поверхности бактериофагов и отбор по сродству к антигену	«Перетасовка» генов, «изменчивые» штаммы, «неточная» ПЦР

Клональная селекция: метод phage display



Гибридные антитела



Методы иммуноанализа

ВВЕДЕНИЕ. В то время как методы ферментативной диагностики уже позволяют достаточно быстро и достоверно определять отдельные компоненты сложных систем, методы иммунодиагностики пока существенно уступают в чувствительности и возможностях применения. Однако развитие радиоиммуноанализа (РИА) и иммуноферментного анализа (ИФА), а также техники гибридом послужило основой для создания иммунологических систем детекции, мировой рынок которых в настоящее время уже превысил 10 млрд долл. США в год.

МЕТОДЫ. Несмотря на высокое сродство антигенов или гаптенов к антителам ($k_{\text{дисс}} 10^{-6}$ – 10^{-8} моль/л), анализ их связывания остается весьма сложной задачей. Для оценки количества антигена в растворе часто используют метод конкурентного иммуноанализа, основанный, как следует из названия, на конкуренции между исследуемым и меченым антигенами за связывание с антителами. Чем больше антигена в исходном растворе, тем меньше репортерного антигена свяжется с антигеном. Все методы иммунодиагностики можно условно разделить на две большие группы: гомогенные методы анализа основаны на непосредственной реакции между антигеном и антителом, в то время как требующие больших затрат, но более чувствительные гетерогенные методы учитывают промежуточные стадии, в частности освобождение от несвязавшихся реагентов. Выбор метода анализа зависит от цели исследования, а также необходимой чувствительности. Чувствительность метода анализа повышается в случае нуклеотидов, содержащих радиоактивный изотоп (радиоактивную метку); при детектировании регистрируется сигнал, пропорциональный концентрации меченого вещества, а применение ферментативных реакций (твердофазный иммуноферментный анализ, ELISA – от *англ.* enzyme-linked immunosorbent assay) приводит к значительному усилению сигнала. При правильно подобранных условиях методом ELISA можно определять пико- или даже аттомолярные концентрации (10^{-12} – 10^{-13} моль/л). Репортерным ферментом «работает» чаще всего пероксидаза или кислая фосфатаза.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ. Для количественной оценки взаимодействия антител и антигенов сравнивают значения, полученные для исследуемой пробы, со стандартными кривыми титрования. В лабораторной практике чаще всего используют планшеты с 96 или 384 лунками и соответствующий сканер (на основе фотометра, флуориметра или люминометра), который в автоматическом режиме осуществляет количественную оценку результата, сравнивая его со стандартными кривыми.

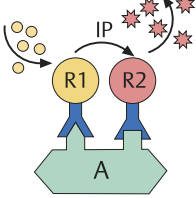
ТЕСТ-ПОЛОСКИ. В фармакологии широко известны тест-полоски – это и есть пример твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Так, тест на беременность основан на определении концентрации хорионического гонадотропина (ХГТ, или *англ.* HCG), содержание которого в крови и моче значительно повышается после оплодотворения яйцеклетки. Тест-полоски также применяются в экстренной медицине, например, для установления поражения сердечной мышцы – инфаркта. При инфаркте в кровь выделяется белок тропонин Т. Кровь больного наносят на тест-полоску, где при прохождении через специальные волокна она освобождается от эритроцитов. Затем по капиллярам жидкость поступает в реакционную зону тест-полоски, где происходит элюция специфических конъюгатов антител и образование комплексов типа «сэндвич». Если комплексы образуются, участок тест-полоски окрашивается за 15 минут в красный цвет. Для качественной оценки результата не требуется никаких специальных устройств – его можно наблюдать визуально, а количественные определения проводят с помощью специального прибора (с CCD-камерой).

ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОАНАЛИЗА.

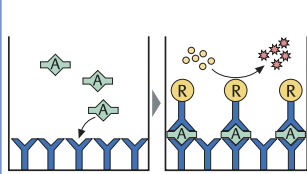
Методы иммуноанализа находят широкое применение в клинической диагностике. Стремительный прогресс в понимании механизмов физиологических процессов, в частности регуляции обмена веществ, позволяет разрабатывать новые методы диагностики заболеваний на самых ранних стадиях. В пищевой промышленности иммуноанализ применяется для обнаружения запрещенных к применению добавок (например, казеин в колбасных изделиях). Иммунологическими методами можно быстро обнаружить присутствие патогенных микроорганизмов и их токсинов. Еще одно важное применение метода иммуноанализа – экологические исследования, например контроль загрязнения сточных вод и почвы различными ксенобиотиками и гербицидами.

Иммуноанализ

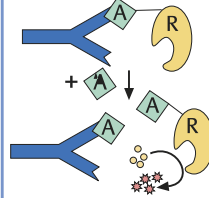
1 Неконкурентный, гомогенный



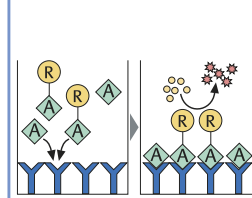
2 Неконкурентный, гетерогенный («сэндвич»-анализ)



3 Конкурентный, гомогенный



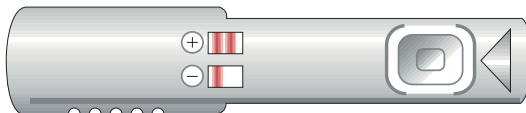
4 Конкурентный, гетерогенный



- Конъюгат: метка – антиген
- Антисген, гаптен
- Антитело
- Субстрат
- Продукт
- Конъюгат: метка – антитело
- Промежуточный продукт

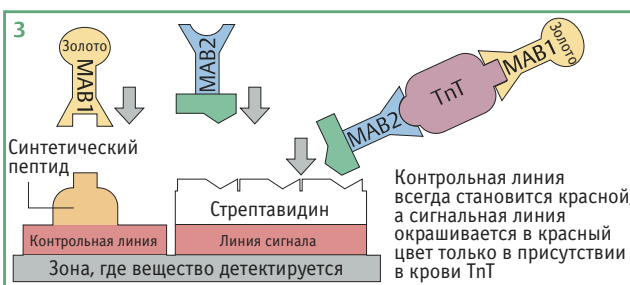
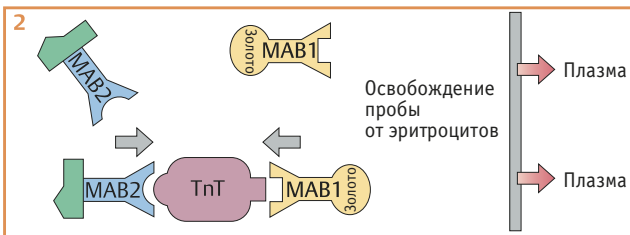
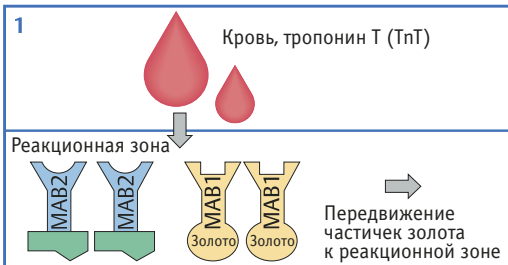
Если в качестве метки используется фермент, первичный сигнал усиливается и чувствительность метода значительно возрастает

Экстренный тест на инфаркт миокарда: тропонин Т

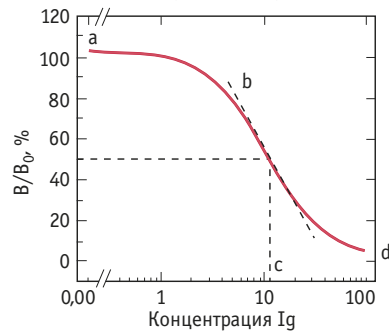


Продолжительность анализа: 15 мин
 Положительный ответ: 2 красных полосы
 Негативный ответ: 1 красная полоса

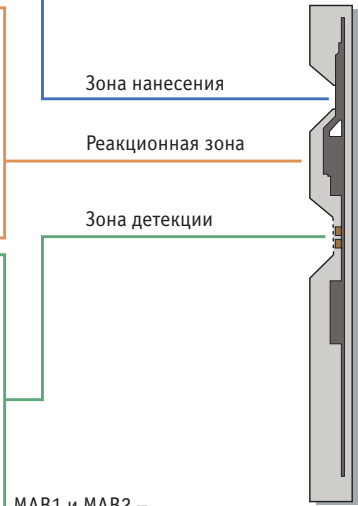
Механизм действия



Метод ELISA, кривая титрования



- B/B_0 % Нормированное значение экстинкции
- a Верхняя ветвь кривой
- b Линейная область (определяет границы чувствительности метода)
- c Точка перегиба
- d Нижняя ветвь кривой



MAB1 и MAB2 – моноклональные антитела 1 и 2

Биосенсоры

ВВЕДЕНИЕ. В биосенсоре объединены чувствительный материал биологического происхождения (фермент, антитела, ДНК, микроорганизмы и т.д.), реагирующий на присутствие определяемого компонента, и физический преобразователь сигнала (электрод, оптрод, светочувствительное устройство, кварцевое оптическое волокно и др). Самое большое распространение получили ферментные и микробные биосенсоры. Объем мирового рынка биосенсоров составляет 5 млрд долл. США.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ. На поверхности датчиков в ферментных биосенсорах иммобилизованы ферменты, чаще всего гидролазы (для измерения pH среды) или оксидазы (для определения концентраций O_2 или H_2O_2). Часто при измерении окислительно-восстановительного потенциала используют так называемые медиаторы. Окислительно-восстановительный потенциал диметилферроцена +100 мВ; это обеспечивает высокую специфичность сенсора: удается снизить фоновые шумы, так что неспецифические реакции с другими компонентами среды, по-видимому, исключены (редокс-потенциал L-аскорбиновой кислоты +170 мВ). Самый известный биосенсор – глюкозный электрод. Он используется при проведении лабораторных анализов крови на «сахар» в медицинских учреждениях, при самоконтроле уровня «сахара» крови, а также с целью контроля питательной среды в производственных биореакторах. Ведутся разработки вживляемых биосенсоров на глюкозу в комплекте с переносным дозатором инсулина; однако такие устройства пока не применяются из-за отторжения иммунной системой организма. Кислородные электроды с иммобилизованными микроорганизмами используются для наблюдения за потреблением кислорода в культуре. На этом же принципе основан контроль сточных вод после очистки. Применение биосенсоров позволяет провести качественную и количественную оценку загрязнения в течение нескольких минут, в то время как традиционный анализ занимает около 5 сут. Иммунный анализ может также проводиться с помощью биосенсоров, в которых участники электрохимической реакции содержат метку. ДНК-биосенсоры позволяют обнаруживать в среде вещества, которые оказывают воздействие на генетический материал. Принцип метода заключается в том, что в результате взаимодействия ДНК с биологически активными веществами происходит изменение физико-химических свойств нуклеиновой кислоты, что обнаруживается с помощью детектора.

ОПТИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ. При взаимодействии антитела и антигена образуется белковый комплекс большего размера с определенными оптическими характеристиками, которые можно анализировать, ис-

пользуя оптическое волокно (световод). Оптические биосенсоры находят очень широкое применение благодаря высокой чувствительности (до 10^{-10} г/л) и возможности получать не только качественные, но и количественные данные.

ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ (ПИА). В строгом смысле слова этот метод не относится к биосенсорным (биологический компонент и преобразователь разнесены в пространстве), однако метод находит все большее применение в иммуноферментном анализе и в исследованиях ДНК. ПИА сочетает в себе аналитический подход и автоматизированную обработку жидких проб, поэтому его часто используют при непрерывном измерении концентрации компонентов пробы. Возможно применение принципа ПИА в сочетании с микросистемной технологией, например нанотехнологией.

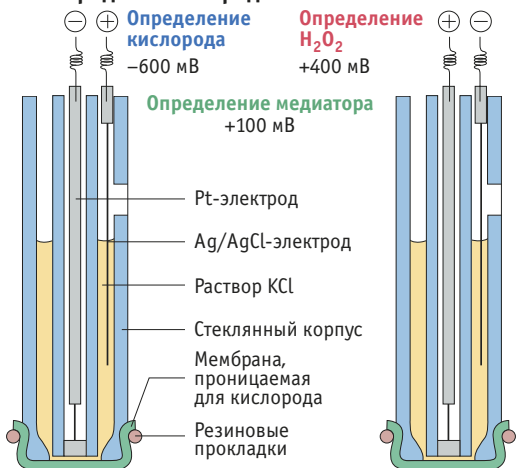
РЕЦЕПТОРЫ КАК БИОСЕНСОРЫ. Хеморецепторы бактерий и органы чувств высших животных – примеры естественных биосенсоров. В отличие от биосенсоров, созданных человеком, рецепторы могут обнаруживать, а затем быстро количественно определять очень сложные комбинированные сигналы (запах розы, аромат вина и др.). Распознавание раздражителя в рецепторах основано на сравнении полученного сигнала с уже известными сигналами. Однако даже самые передовые технологии биосенсорики пока не позволяют создать прибор, приближающийся к рецепторам по чувствительности и многообразию принимаемых сигналов.

Биосенсоры

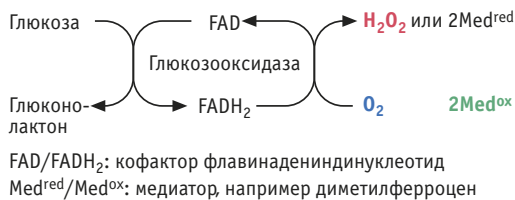
	Биологически активный компонент	Преобразователь
Ферментные электроды		
Амперометрические	Оксидазы	O ₂ -электрод
Потенциометрические	Гидролазы	Ионселективный электрод
Ферментные полевые транзисторы	Гидролазы	Полевой транзистор
Микробные сенсоры	Микроорганизмы	O ₂ -электрод Ионселективный электрод
Пьезосенсоры	Антитела	Жидкий кварц
Оптические сенсоры	Антитела, ДНК	Световод с сетчатым элементом, поверхностный плазмонный резонанс

Подготовка образца осуществляется, например, с помощью ПИА, а для обработки электронного сигнала может применяться нейронная сеть.

Кислородный электрод

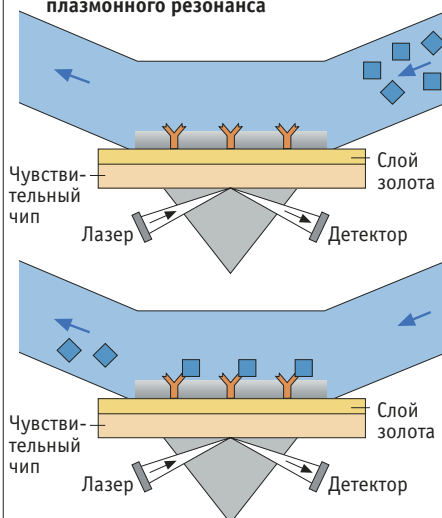


Определение глюкозы



Оптический биосенсор

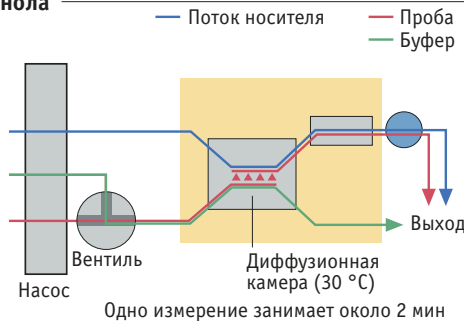
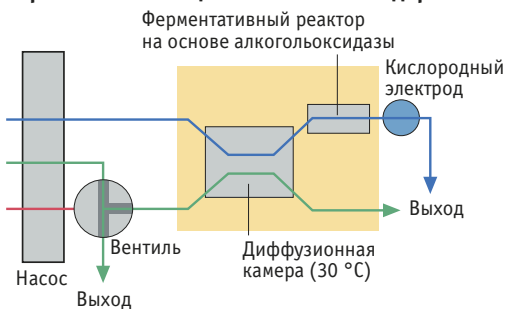
Принцип поверхностного плазмонного резонанса



Если в анализируемой смеси присутствует компонент, реагирующий с антителом, то в результате этого взаимодействия происходит изменение показателя преломления. Это изменение регистрируется детектором

- Исследуемое вещество (антиген)
- Толщина слоя золота
- Чувствительный чип
- Капилляры
- ⌋ Рецептор (антитела к антигену)

Проточно-инжекционный анализ содержания этанола



Животноводство

ВВЕДЕНИЕ. Со времен неолита уже почти 11 000 лет человек приручал собак, овец и коз, около 8 000 лет – коров и свиней. Основной задачей тогда было приручение и увеличение численности этих животных, в настоящее же время задача животноводства – дать человеку высококачественные продукты питания (мясо, молоко, яйца) и сырье для изготовления одежды (шерсть). За последние 30 лет производительность мясных коров, которая составляла 300 кг на животное в год и молочных коров – 10 000 л молока на животное в год, увеличилась почти вдвое. Еще с древности человек занимался скрещиванием видов и селекцией с целью изменения фенотипических признаков диких видов. В современном животноводстве наряду с классическими методами популяционной генетики и методов биометрического анализа используются такие био- и генно-инженерные подходы, как искусственное осеменение, оплодотворение *in vitro* (IVF) и перенос зародышей, построение генетических карт. Однако до сих пор трансгенные и клонированные животные используются только в исследовательских целях, но не в практическом животноводстве.

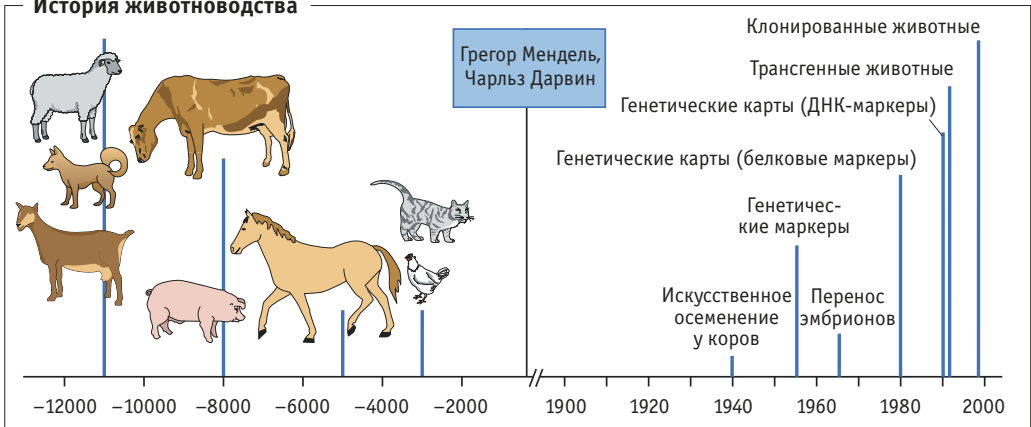
ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ. Первое упоминание об искусственном осеменении в собаководстве относится к 1729 г. В 1942 г. в Германии появилась первая станция искусственного осеменения крупного рогатого скота. Это относительно дешевый метод; прежде всего проводят отбор мужских особей с наилучшими качествами. Из зякулята одного быка можно получить 400 порций спермы, в каждой по 20 млн сперматозоидов. Смесь спермы с антифризными добавками подвергают глубокому охлаждению при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранят. Отбор производителей начинают с молодняка, прошедшего предварительный контроль по прибавке веса, молочности материнской линии, форме тела и качеству спермы. За период отбора, который длится примерно 4 года, определяется молочно-мясной потенциал будущего поколения (производительность потомства). Один донор спермы может заменить примерно 1000 быков. Оплодотворение женских особей размороженной спермой осуществляется ветеринаром, специалистом по оплодотворению или животноводом непосредственно на ферме. В развитых странах около 90% молочных коров осеменяется искусственным путем. У свиней искусственному осеменению подвергаются около 60% свиноматок.

ОПЛОДОТВОРЕНИЕ *IN VITRO* (IVF) И ПЕРЕНОС ЭМБРИОНОВ (ET) используется для повышения темпов размножения женских особей животных с ценными признаками. Метод переноса эмбрионов заключа-

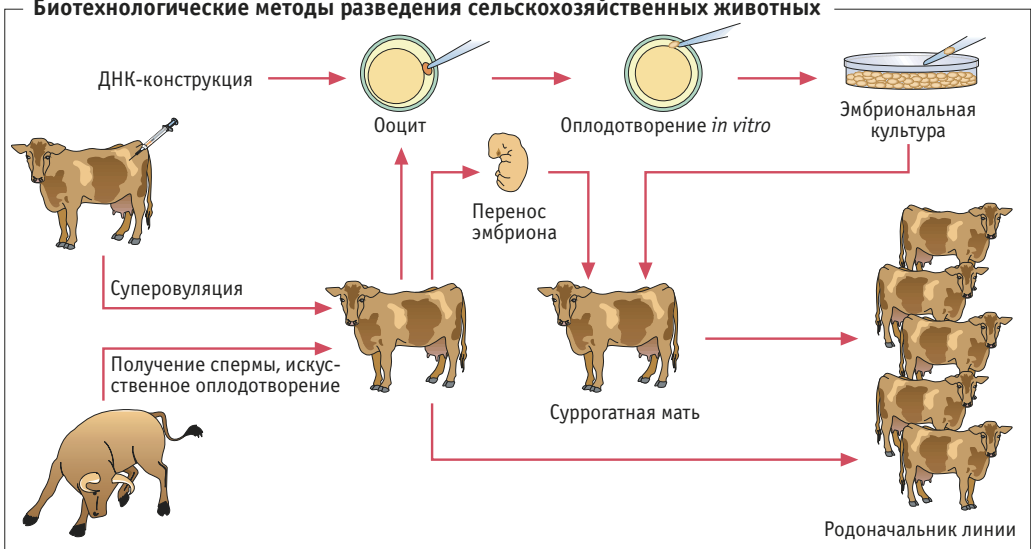
ется в том, что с помощью введения гормонов стимулируют суперовуляцию у самок и осуществляют их искусственное оплодотворение. При этом можно получить до восьми эмбрионов, пригодных к пересадке; из них после пересадки в ложнобеременную суррогатную мать развивается в среднем четыре теленка. Эта процедура весьма дорогостоящая, поэтому она используется только для животных, представляющих особый интерес для сельского хозяйства. Широко применяется также оплодотворение яйцеклеток вне женских половых путей: для этого используют специальные методы культивирования и хранения полученных таким образом эмбрионов. У коров яйцеклетку изымают путем бескровной операции, у других животных (овец и свиней) – при обычном оперативном вмешательстве. Через 3–6 часов уже можно определить пол эмбрионов методом ПЦР. У коров оплодотворение *in vitro* широко используется на практике: отобранные по полу эмбрионы поступают в продажу, и могут быть перенесены в суррогатную мать.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КАРТЫ. Долгое время ведутся работы по получению генетических карт домашних животных, прежде всего отвечающих за ценные для сельского хозяйства признаки. Для моногенных признаков (обусловленных одним геном) наследование можно проследить при помощи ПЦР и ПДРФ*. Примером важного моногенного признака является устойчивость к стрессу, обусловленная риадиноновым рецептором у свиней, и признаки, обусловленные различными генами, кодирующими белки молока у коров. Однако чаще всего ценные признаки являются полигенными, так что анализ их наследования затруднен.

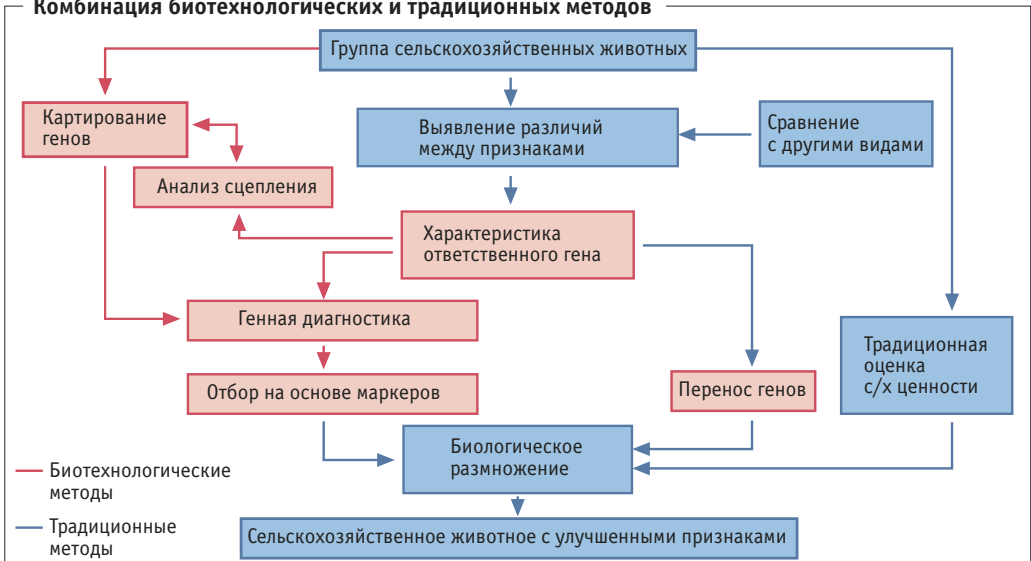
История животноводства



Биотехнологические методы разведения сельскохозяйственных животных



Комбинация биотехнологических и традиционных методов



Перенос эмбрионов и клонирование животных

ВВЕДЕНИЕ. Остановимся отдельно на методах супероуляции и культивирования эмбрионов, переноса эмбрионов в суррогатную мать для получения клонированных или трансгенных эмбрионов и получения клонированных животных.

ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. Яйцеклетка млекопитающих после метафазы второго деления высвобождается из яйцевода в виде ооцита II. Затем происходит слияние яйцеклетки со сперматозоидом и оплодотворение, образуется второе полярное тельце. И в материнском, и в отцовском гаплоидном пронуклеусе происходит удвоение ДНК, после чего пронуклеусы сливаются с образованием диплоидного ядра зиготы; образуется первая разделительная бороздка. В результате последующих делений вплоть до образования морулы клеточное ядро увеличивается в размерах. На стадии морулы начинается первая дифференцировка клеток в бластоцисты. Это происходит в матке после растворения внеклеточной оболочки яйцеклетки (*zona pellucida*), и возникает эмбрион (зародыш).

СУПЕРОУЛЯЦИЯ И ВЫРАЩИВАНИЕ ЭМБРИОНОВ. У большинства видов животных количество эмбрионов можно увеличить путем введения самке гормонов (супероуляция). Существует и другой подход: можно выделить яйцеклетку, оплодотворить ее *in vitro* (IVF) и, культивируя в соответствующей питательной среде в лабораторных условиях (*ex vivo*), вырастить до эмбриона. По экономическим соображениям такие эксперименты проводятся в основном только с эмбрионами коров и овец; известно, что эмбрионы этих животных сохраняются при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ практически неограниченное время (криоконсервация).

ПЕРЕНОС ЭМБРИОНОВ. Под термином «перенос эмбрионов» понимают пересадку эмбрионов животного суррогатной матери того же биологического вида. Эмбрионы могут быть получены путем супероуляции, или искусственного оплодотворения, животных-доноров. При клонировании эмбрионов из морулы микрохирургическими методами выделяют несколько бластомеров, которые после переноса в суррогатную мать развиваются в генетически идентичных животных. От одной коровы можно получить от 6 до 20 пригодных к переносу эмбрионов, которые примерно в 50% случаев будут успешно выношены. Широкого практического применения методы переноса эмбрионов пока не находят.

ТРАНСГЕННЫЕ ЭМБРИОНЫ. На стадии ооцита или бластоцисты в пронуклеус или в эмбриональные стволовые клетки можно ввести синтетические генетические конструкции. Наиболее часто эту процедуру осуществляют при помощи микроинъекций. Введение гетерологичной ДНК позволяет выключать некоторые собственные гены (*knock-out*) или экспрессировать

чужеродные гены (функциональное *замещение*). Полученные трансгенные эмбрионы переносят в суррогатную мать и получают таким путем трансгенных животных. Первые работы в этой области проводились на мышах — основных модельных организмах, которые используются при проведении фундаментальных исследований, а также при испытаниях фармацевтических препаратов. Этот метод со временем может также найти применение и при разведении сельскохозяйственных животных с ценными признаками и, возможно, заложит основы концепции *генетической фермы*.

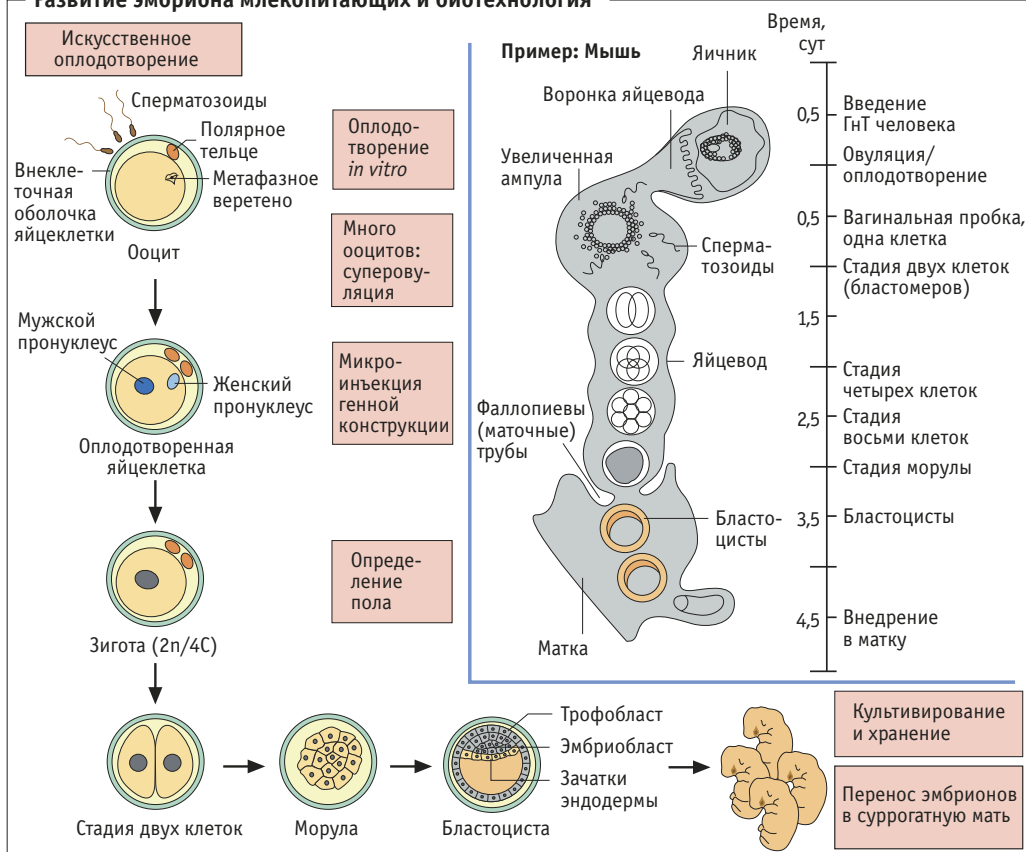
КЛОНИРОВАННЫЕ ЖИВОТНЫЕ. Бесполой способ размножения широко распространен среди одноклеточных, растений и низших животных. У высших животных идентичные клоны встречаются в естественных условиях очень редко — в случае гомозиготных (однойяйцевых) близнецов (среди людей частота встречаемости 0,3%). Для искусственного получения клонов животных у одного животного берут яйцеклетку (с гаплоидным набором хромосом) и удаляют ядро при помощи микропипетки. В соматических клетках этого же животного (например, в культуре клеток эпителия вымени) индуцируют G₀-фазу, в которой не происходит деления клеток, после чего одна клетка на стадии G₀-фазы (диплоидный набор хромосом) сливается с безъядерной яйцеклеткой. Полученную яйцеклетку можно подрастить в культуре клеток или в яйцеводе стерилизованной матери до развития эмбриона, после чего эмбрион переносят в организм суррогатной матери для вынашивания. В 1997 г. ученым впервые удалось получить клон (т. е. животное, генетически идентичное донору) из одной диплоидной соматической клетки взрослой особи. Клонированная овца Долли — единственный выношенный ягненок из 29 развившихся эмбрионов, полученных из 277 безъядерных яйцеклеток. С тех пор метод был успешно применен на мышах, козах, свиньях и коровах, и в дальнейшем он может быть использован прежде всего для создания продуктивного стада крупного рогатого скота молочной породы (*генетическая ферма*).

Регуляция цикла и суперовуляция

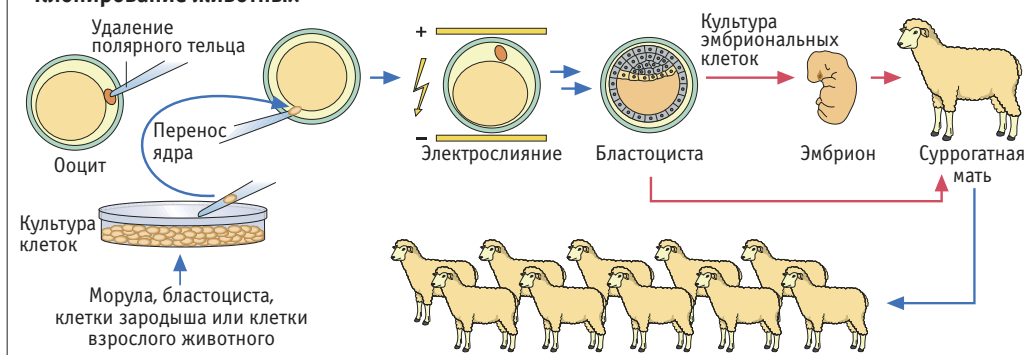
	Метод получения	Эффект
Простагландин PGF24	Химический синтез	Атрофия желтого тела вызывает течку
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, или англ. FSH)	Из гипофиза свиней или рекомбинантный	Стимуляция фолликулов приводит к суперовуляции
Гонадотропин сыворотки крови жеребой кобылы (PMSG)*	Из сыворотки крови жеребой кобылы	Стимуляция фолликулов вызывает течку и приводит к суперовуляции
Гонадотропин-высвобождающий гормон (ГнРФ, или англ. GnRH)	Химический синтез	Индукцирует овуляцию

* Другое сокращение eCG (от англ. equine chorygonadotropin – хоригонадотропин лошади)

Развитие эмбриона млекопитающих и биотехнология



Клонирование животных



Картирование генов

ВВЕДЕНИЕ. Классические методы животноводства по скрещиванию и селекции основаны на генетике. Селекционеры, применяя методы математической статистики, могут оценивать влияние на фенотип окружающей среды и генетических особенностей. Для наиболее важных сельскохозяйственных и домашних животных (лошадей, коров, свиней, овец, коз, кур, собак и кошек) созданы подробные генетические карты, построенные на наблюдениях за наследованием сцепленных генов. На генетической карте указано местоположение гена на конкретной хромосоме. Геномы большинства домашних животных имеют размер около 3 млрд пар оснований и по сложности сопоставимы с геномом человека. В 2005 г. опубликованы последовательности геномов курицы и лошади. Для коровы, свиньи, лошади и кошки существуют достаточно подробные карты сцепления генов, включающие в качестве маркеров тысячи микросателлитов и сотни функциональных генов на вид. Благодаря этому у селекционеров есть возможность методом ПЦР устанавливать связи между генетическими и фенотипическими характеристиками разводимых животных.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ. Идентифицировать признаки, целевые в животноводстве (например, удойность), с определенными генами очень сложно, это все равно что собрать мозаичную картину из десятков тысяч весьма сходных, но разных по происхождению фрагментов (родители и потомки). Поэтому животноводы-селекционеры стараются унифицировать условия содержания животных и таким образом упростить генетический анализ. При помощи сложных статистических методов (BLUP, от англ. best linear unbiased prediction – наилучшая линейная несмещенная оценка) можно оценить степень воздействия окружающей среды и генетических данных на изменение признаков. В результате искусственно-го оплодотворения и переноса эмбрионов можно получить группы животных, у которых влияние одного из родителей гораздо легче проследить по генетическому наследованию у потомков. Однако ни один из этих методов не позволяет проанализировать влияние одного аллеля гена на сложные признаки.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КАРТЫ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА. Анализ геномов млекопитающих – достаточно дорогое исследование, в частности из-за размера геномов и ограничений метода секвенирования ДНК (~600 п. н. за реакцию). Задача облегчается при наличии маркерных точек на ДНК, находящихся на определенном расстоянии от гена или генного участка, при условии, что генетический материал родителей обладает полиморфизмом и дает расщепление при наследовании. Такими маркерами являются микросателлиты (VNTR – последовательности с разным коли-

чеством tandemных повторов). Микросателлитным ДНК, на долю которых приходится около 20% последовательности ДНК в геноме млекопитающих, принадлежит важная роль в генетическом и физическом картировании геномов. Один из методов анализа ДНК-маркеров – это анализ ПДРФ (полиморфизм длины рестриктных фрагментов): геномную ДНК или кДНК родителей и потомков расщепляют эндонуклеазами рестрикции и сравнивают картины расщепления при помощи гель-электрофореза. Таким образом получают карты рестриктоного полиморфизма, которые при благоприятном стечении обстоятельств коррелируют с признаками и могут быть использованы в селекции. Если положение одного из интересующих генов в последовательности геномной ДНК известно, с помощью метода ПЦР можно амплифицировать соответствующий участок и проанализировать различия последовательностей ПЦР-продуктов. Однако сначала надо получить достоверную информацию об экзон-интронной структуре соответствующего гена, т. е. о структуре мРНК после сплайсинга (по последовательности кДНК). Для коммерчески важных домашних животных, таких как куры, коровы и свиньи, на сегодняшний день созданы генетические карты, базирующиеся на наблюдениях за наследованием признаков, генов или ДНК-маркеров (рекомбинация путем кроссинговера при мейозе). При анализе сцепления можно получить данные о расположении генов и маркеров на хромосомной ДНК.

Трансгенные животные

ВВЕДЕНИЕ. Трансгенных животных, в которых экспрессирован чужеродный ген (*knock-in*) или выключен какой-либо собственный ген (*knock-out*), используют в фундаментальных исследованиях для моделирования некоторых заболеваний человека, для получения белков молока (генетическая ферма). В медицине наиболее важное модельное животное — мышь (*Mus musculus*), которую легко выращивать и которая по своим физиологическим особенностям близка к человеку.

ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ. Для того чтобы свести к минимуму побочные эффекты, обусловленные гетерозиготностью наследуемых признаков, трансгенных животных, как правило, получают из близкородственных линий. Линии мышей становятся практически полностью гомозиготными после 7–10 близкородственных скрещиваний. Для введения чужеродного генетического материала (*knock-in*) чаще всего используют микроинъекцию генной конструкции в пронуклеус эмбриональной стволовой клетки (ЭСК). Этот метод довольно быстрый, однако количество выживающих эмбрионов невелико. В качестве векторов используют генные конструкции, содержащие промотор, чужеродный ген с экзонами и интронами и сигнал полиаденилирования. Часто встраивание такого вектора в геном животного происходит в нескольких местах, то есть ген встраивается в нескольких копиях. Для выключения генов (*knock-out*) предпочитают проводить трансфекцию эмбриональных стволовых клеток *in vitro*. В результате кроссинговера или индуцированного двухцепочечного разрыва происходит рекомбинация между последовательностью ДНК и вектором, несущим последовательности, гомологичные последовательности исследуемого гена, но не кодирующие функциональный генный продукт, что приводит к инактивации природного гена. В составе вектора обычно присутствует маркерный ген, что позволяет контролировать эффективность встраивания. Другой способ носит название «генной ловушки» (*gene targeting*): репортерный ген встраивается в кодирующие или регуляторные последовательности собственных генов. Методом генной ловушки место встраивания определяется достаточно точно, и происходит интеграция только одной копии гена. Для выключения генов используют также *антисмысловые* конструкции. Потомков, содержащих новый рекомбинантный ген или выключенный ген в одной из своих половых клеток (химерные зародыши), используют для дальнейшего размножения в качестве животного-основателя.

ТРАНСГЕННЫЕ МЫШИ. Самок мышей, у которых в результате однократной внутрибрюшинной инъекции гонадотропина (НСГ) была вызвана суперовуляция, скрещивают с самцами. Из яйцедодов выделяют морулу или бластоцисту, которые затем трансформируют. При трансфекции из бластоцист получают эмбри-

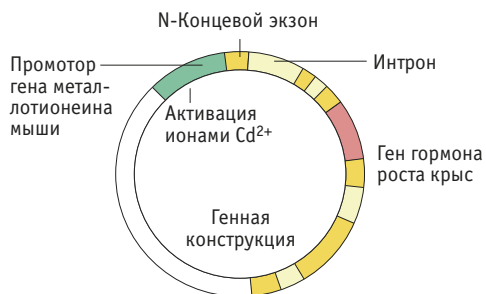
ональные стволовые клетки (ЭСК), которые являются плюрипотентными и могут размножаться в клеточной культуре. Их трансфицируют ДНК-вектором и внедряют обратно в бластоцисту. При микроинъекции вектор с чужеродной ДНК вводят в крупный мужской пронуклеус, который хорошо виден под микроскопом в оплодотворенной яйцеклетке. Трансформированные бластоцисты или яйцеклетки имплантируют в матку самкам, у которых в результате спаривания с вазэктомизированным самцом была стимулирована ложная беременность.

ПРИМЕНЕНИЕ. В 1982 г. повышенный интерес ученых и общественности вызвало получение трансгенной «супермыши» путем микроинъекции гена гормона роста в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Если предполагается, что причиной какого-либо заболевания является мутация определенного гена, подтверждение этому можно получить, используя трансгенных животных: введение интактных генов (*knock-in*) должно привести к восстановлению нарушенной функции. Если фенотип животного становится нормальным, участие данного гена в возникновении болезни можно считать доказанным. У *мышей со злокачественной опухолью* активированный онкоген *v-Ha-ras* связывается с эмбриональным промотором, что при повреждении эпидермиса приводит к развитию рака кожи. Мышей этой линии можно использовать для тестирования различных мутагенов. Трансгенных мышей с мутациями в белке-предшественнике β -амилоида (APP) используют в качестве модели для изучения болезни Альцгеймера. Мыши с ТКИД (тяжелым комбинированным иммунодефицитом) служат моделями иммунных заболеваний. В середине 2005 г. в свободной продаже появились тысячи трансгенных линий мышей. Поскольку анализ генома различных линий мышей уже завершен, использование трансгенных мышей облегчает функциональный анализ генома человека.

«Супермышь»



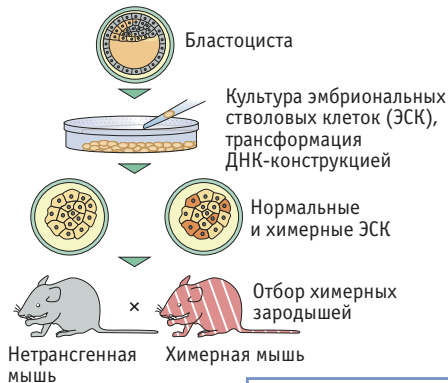
Мышь, полученная в результате микроинъекции генной конструкции с геном соматотропина в пронуклеус оплодотворенной мышиной яйцеклетки. Справа – контрольная мышь



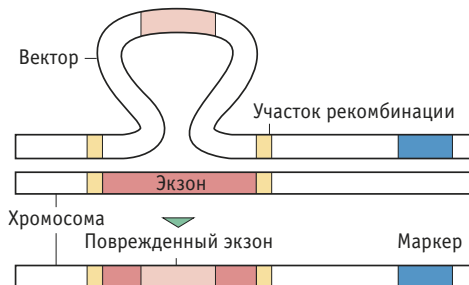
Трансгенные мыши

«Нокаутные» мыши

Метод: эмбриональные стволовые клетки



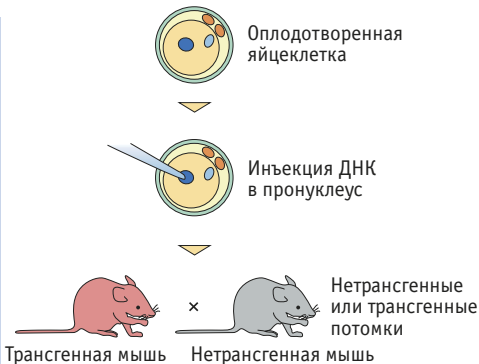
Генная конструкция для получения «нокаутной» мыши



Донор эмбрионов

Трансгенная мышь

Метод: инъекция в пронуклеус



Генная конструкция для получения трансгенной мыши



Линии мышей*, применяемые в исследованиях

Изменения/дефекты	Модель заболевания
Традиционное разведение	Голые или облысевшие мыши, исследования чувствительности кожи
Клонированный ген соматотропина	«Супермыши»
Дефекты иммунной системы	ТКИД-мыши: мыши с ослабленным иммунитетом
Дефект белка p53, подавляющего развитие опухоли	Мыши со злокачественной опухолью: канцерогенез
Дефект ангиотензиногена	Мыши с повышенным кровяным давлением
Дефект CFTR (муковисцидоз)	Мыши с муковисцидозом (для генной терапии)

* В 2005 г. были описаны уже тысячи трансгенных линий мышей. Многие из них коммерчески доступны

Генетическая ферма и ксенотрансплантация

ВВЕДЕНИЕ. Для сельского хозяйства большой интерес представляют трансгенные животные, обладающие «улучшенными» признаками. Однако из-за дороговизны методов и бурных общественных дискуссий об этических аспектах и мерах безопасности при разведении трансгенных животных в настоящее время их не используют для получения пищевых продуктов. На генетических фермах выращивают трансгенных мышей, овец, коз или коров и получают важные с медицинской точки зрения белки в молоке, откуда их легко выделить. Такой метод, как и в случае трансгенных растений, позволяет значительно увеличить выход продукта и может конкурировать с методами синтеза рекомбинантного белка в клетках или в биореакторе. Трансгенных свиней выращивают для получения органов для ксенотрансплантации (прежде всего трансплантации сердца).

ЖИВОТНОВОДСТВО. Основной целью создания трансгенных сельскохозяйственных животных является увеличение их веса, что достигается за счет эндогенного синтеза соматотропина в результате переноса генов. Кроме того, животноводы пытаются повысить устойчивость животных к стрессу и болезням, а также улучшить ряд качественных признаков. У млекопитающих перенос генов осуществляется в основном путем микроинъекций в ядро яйцеклетки или путем переноса эмбрионов, у домашней птицы – посредством рекомбинантных ретровирусов или оплодотворения яйцеклеток сперматозоидами, несущими генные конструкции. Трансгенных рыб получают введением ДНК в яйцеклетки электропорацией. В качестве примеров можно привести снижение восприимчивости к болезням (например, ген устойчивости к стрессу *gurl1* у свиней) и усиление холодостойкости за счет клонированного гена антифризного белка.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ФЕРМА. Ценные для медицины белки можно получать в молоке трансгенных животных. Для этого ген белка клонируют под контролем β - или α S1-казеинового промотора в ядре оплодотворенной яйцеклетки и переносят зиготу или выращенный *ex vivo* эмбрион в суррогатную мать. Выход трансгенных животных при таком подходе незначителен (< 0,1% использованных яйцеклеток), однако в случае успеха сразу получается трансгенное животное, синтезирующее необходимый белок (например, α 1-антитрипсин, tPA, урокиназу, IGF-1, IL-2, лактоферрин или сывороточный альбумин человека) в количестве до 35 г/л молока. Продукт можно выделить из молока или употреблять непосредственно с молоком. Если считать, что одна дойная корова дает 10 000 л молока в год, то одной трансгенной коровы хватит, например, для того чтобы удовлетворить потребность системы здравоохранения США в факто-

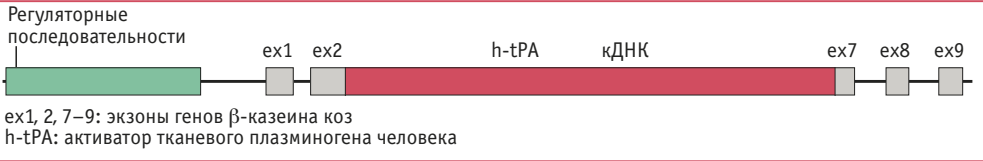
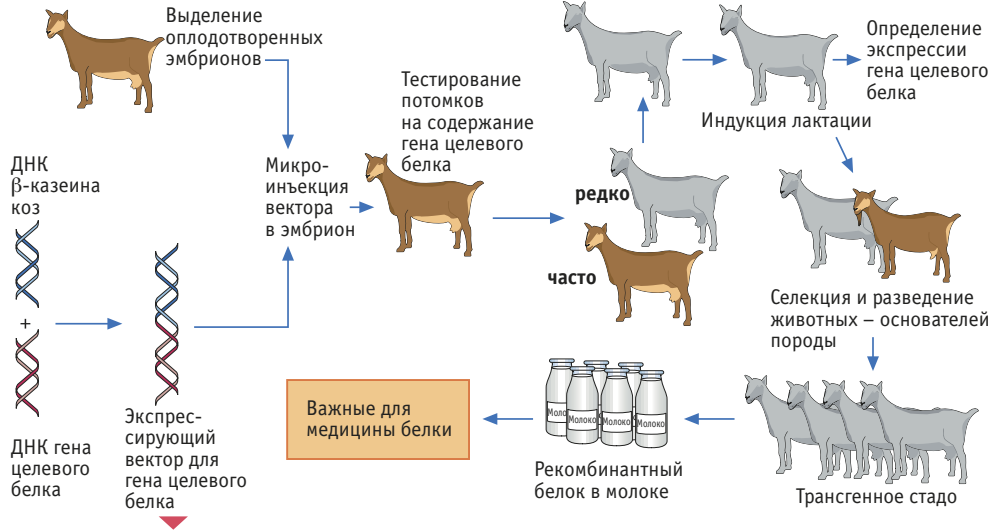
ре VIII (120 г). Пока, однако, получать медицинские препараты таким методом не разрешается.

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ. Благодаря трансплантации были спасены жизни более 200 000 человек. В США трансплантации сердца ожидают около 45 000 человек, однако ежегодно лишь 2000 человек получают «новое» сердце. В качестве доноров органов могут быть использованы трансгенные животные. Лучше всего из домашних животных для этого подходят свиньи, поскольку их органы и органы человека имеют сходный размер, анатомию и физиологию. Основной проблемой при ксенотрансплантации является реакция отторжения чужеродных органов. При этом различают 1) гиперострое отторжение (от секунд до нескольких минут), которое вызвано быстрой активацией системы комплемента реципиента; 2) острое отторжение (сутки), обусловленное реакцией Т-клеток, встречается также при пересадке органов от одного человека другому; 3) хроническое отторжение (до нескольких лет), точные причины которого пока не установлены. При пересадке органов из организма другого вида первоочередной задачей является предотвращение гиперострого отторжения. С этой целью были выведены трансгенные свиньи, у которых в каскаде реакций комплемента принимают участие некоторые факторы человека. В первую очередь речь идет о hCD55 (*фактор усиления распада*, DAF). Приматы, которым пересаживали сердца трансгенных свиней с этим фактором, жили до 40 дней, тогда как контрольные животные с сердцами от нетрансгенных доноров погибали в течение нескольких минут.

Изменение свойств сельскохозяйственных животных

		Мишень
Свиньи	Синдром злокачественной гипертермии: обмен Са в мышцах	Рианодиновый рецептор, 6-я хромосома Cys ^x → Arg
Коровы	κ-Казеин: качество молока	Ген κ-казеина
Лосось	Антифризный белок: устойчивость к экстремальным температурам	Клонирование гена антифризного белка камбалы

Получение фармацевтических продуктов с использованием трансгенных животных



Экспрессия важных для медицины белков в молоке трансгенных лабораторных животных

Генная конструкция	Рекомбинантный белок	Выход продукта, мг/л	Трансгенное животное
Кислый белок сыворотки	tPA (κДНК)	0–50	Коза
Кислый белок сыворотки	Белок С (κДНК)	1 000	Свинья
β-Лактоглобулин	α ₁ -Антитрипсин (геномный)	35 000	Овца
β-Лактоглобулин	Сывороточный альбумин человека	10 000	Мышь
β-Казеин коз	tPA (κДНК)	3 000	Коза
αS1-Казеин коров	Урокиназа (геномная)	2 000	Мышь
αS1-Казеин коров	Инсулиновый фактор роста (IFG-1) (κДНК)	10 000	Кролик

Использование трансгенных животных в производстве медицинских препаратов

Белок	Потребность в белке в США, кг/год	Объем плазмы человека, л	Необходимое количество молочных коров с удоем 10 000 л/год
Фактор VIII	0,120	1 200 000	1,2
Белок С	100	20 000 000	100
Фибриноген	200	500 000	20
α1-Антитрипсин	800	4 000 000	80
Сывороточный альбумин	100 000	2 000 000	5 000

Растениеводство

ВВЕДЕНИЕ. Вот уже около 11 000 лет – со времен «революционного неолита» – люди культивируют растения и пытаются повышать их урожайность различными способами. В результате длительной селекции возникли современные культурные растения, которые отличаются от диких предков по количеству биомассы, продуктивности и количеству семян. Люди и домашние животные питаются преимущественно этими культурными растениями. Однако уже сегодня из 6 млрд человек на Земле почти треть не получает полноценного питания. Если учесть прогнозируемое удвоение населения Земли в последующие 50 лет, становится очевидной необходимость увеличения количества выращиваемых растений.

РАСТЕНИЕВОДСТВО. Успехи растениеводства оцениваются по числу сортов различных растений с типичными признаками, передающимися по наследству. Новый сорт растения возникает как результат скрещивания и отбора. По способу размножения и оплодотворения, генетической структуре и составу различают линейные, популяционные, синтетические, клонированные и гибридные сорта. Генетически гомогенные линейные сорта получают при самоопылении растений, таких как пшеница, рис, ячмень или сахарный тростник. Большинство цветковых растений, например кукуруза, картофель, соя и сахарная свекла, перекрестноопыляемые, их популяции чаще всего представлены гетерозиготными линиями. Если допустить вегетативное размножение, например, картофеля или сахарного тростника можно получить клонированный сорт с выровненным генотипом. Близкородственное скрещивание позволяет получать гомозиготные гибридные сорта перекрестноопыляемых растений. Для этого у таких растений, как кукуруза, удаляют мужские соцветия, однако для цветков, несущих и мужские и женские органы, это очень сложная операция. Решить проблему поможет использование стерильных мужских линий растений, которые можно получить двумя способами: из растений с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС, кодируется митохондриальным геномом) или при помощи самонесовместимых линий (СНЛ) – широко распространенного в природе способа избежать самооплодотворения. Гетерозиготные особи часто значительно сильнее гомозиготных, вероятно за счет того, что генные продукты обоих аллелей с меньшей вероятностью инактивируются или проявляют большую реакционную способность. Это явление (гетерозис) достигается в сельском хозяйстве путем возвратного скрещивания, так же как в случае штаммов продуцентов антибиотиков. Аналогичные способы применяют в садоводстве: в настоящее время выведено около 11 000 сортов садовых

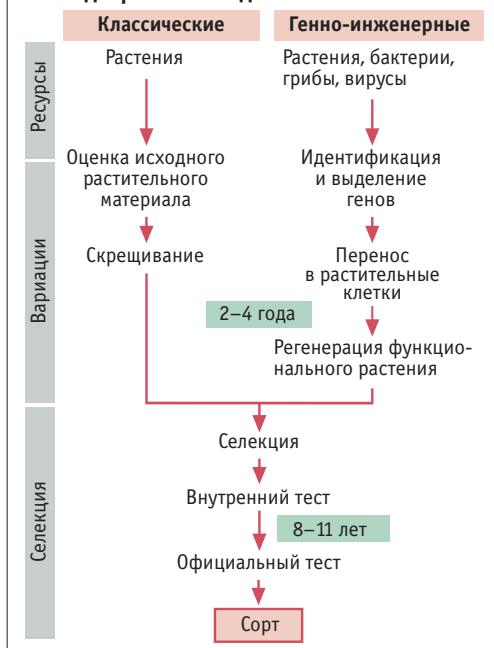
растений. В Германии эта отрасль хозяйства приносит прибыль около 10 млрд евро в год.

ЛЕСНОЕ ХОЗЯЙСТВО. Уже в древности люди заметили, что варварское отношение к лесам приводит к вымиранию и опустошению местностей, однако и в наши дни человек продолжает вырубать лес, в частности во влажных тропиках. В 1800 г. в странах средней и северной Европы впервые стали применять практику устойчивого лесопользования (возраст вырубаемых елей – примерно 100 лет, дубов – примерно 300 лет). Древесина (годовое производство составляет $7 \cdot 10^7$ т) – ценное сырье в химической и целлюлозно-бумажной промышленности, из нее получают также пиломатериалы, обрезную доску, мебель и т.д.

СОВРЕМЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

Для получения стерильных мужских линий в растениеводстве можно использовать генетические методы, например клонирование гена высокоактивной РНКазы из *Bacillus amyloliquefaciens* под контролем специфичных для пыльцы промоторов, что приводит к засыханию пыльцы. Регуляция процесса осуществляется при помощи *Restorer*-гена, продукт которого ингибирует РНКазы. Развитие методов получения каллусной, меристемной, протопластной и гаплоидных культур и их регенерации в целые ди- и гаплоидные организмы совершило настоящую революцию в растениеводстве, значительно сократив затраты времени по сравнению с классическими процедурами селекции. Трансгенные растения могут экспрессировать факторы устойчивости к вирусам, грибам, бактериям, гербицидам и инсектицидам, а также обладать различными полезными или декоративными свойствами. Секвенирование геномов растений должно способствовать дальнейшему развитию растениеводства.

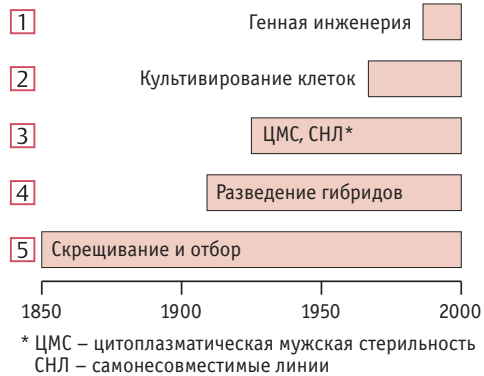
Методы растениеводства



Получение культурных растений (2000 г.)

Название	Мировой урожай, млн т
Тростниковый сахар <i>Saccharum officinale</i>	1 260
Кукуруза <i>Zea mays</i>	594
Рис <i>Oryza sativa</i>	594
Пшеница <i>Triticum aestivum</i>	584
Лен <i>Linum usitatissimum</i>	503
Картофель <i>Solanum tuberosum</i>	321
Сахарная свекла <i>Beta vulgaris</i>	246
Маниок <i>Manihot esculenta</i>	175
Соевые бобы <i>Glycine max</i>	161
Сладкий картофель <i>Ipomoea batatas</i>	142
Ячмень <i>Hordeum vulgare</i>	132
Томаты <i>Lycopersicon esculentum</i>	98
Виноград <i>Vitis vinifera</i>	64
Сорго <i>Andropogonoideae</i>	58

Этапы выведения сортов



Сравнение растительных геномов

Вид	Число хромосом	Плоидность	Размер генома, 1000 млн п. н.
Однодольные			
Ячмень <i>Hordeum vulgare</i>	7	2	4,8
Рис <i>Oryza sativa</i>	12	2	0,42
Пшеница <i>Triticum aestivum</i>	7	6	16
Кукуруза <i>Zea mays</i>	10	2	2,5
Двудольные			
Резуховидка <i>Arabidopsis thaliana</i>	5	2	0,1
Рапс <i>Brassica napus</i>	19	2	1,23
Томат <i>Lycopersicon esculentum</i>	12	2	1
Табак <i>Nicotiana tabacum</i>	12	4	4,4
Картофель <i>Solanum tuberosum</i>	12	4	1,8

Культивирование растительных клеток: поверхностные культуры

ВВЕДЕНИЕ. Около сорока лет назад стало возможным выращивать ткани и клетки органов растений (например, корней или листьев) в виде культуры тканей. Обработывая такие культуры фитогормонами, можно получить целые растения, способные к воспроизводству. Культуры растительных клеток используют: 1) в фундаментальных исследованиях; 2) для выведения растений с улучшенными качествами; 3) для получения устойчивых к вирусам декоративных и садовых растений; 4) для получения трансгенных растений; 5) для сохранения исчезающих растений в виде способных к регенерации культур клеток (зародышевая плазма). Из культур растительных клеток также возможно получение препаративных количеств вторичных метаболитов.

МЕТОДЫ. Из органа растения, выращенного в стерильных условиях из семени, выделяют эксплант (ткань) и переносят ее на твердую или жидкую питательную среду. Большинство клеток и тканей гетеротрофны, поэтому для роста им необходимы источники углерода, например глюкоза или сахароза, и азота — нитрат. Среда, где происходит рост культуры, должны содержать витамины, микроэлементы, растительные цитокинины, например кинетин и зеатин, и стимуляторы роста — 3-индолилуксусную, (2,4-дихлорфенокси)уксусную и абсцизовую кислоты. В случае труднокультивируемых клеток применяют специальные сложные среды. Культуры поддерживают в стерильных контролируемых условиях (свет, воздух, температура) в климатических камерах. По способу культивирования различают каллусные и суспензионные культуры, а по типу клеток получаемого материала — меристемные и гаплоидные культуры.

КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ. Каллусом называют неоформленную взрослую раневую ткань, которая возникает в местах выделения эксплантов у растений. Каллусы выращивают в чашках с агаром в виде поверхностных культур, после чего они служат исходным материалом для получения культур недифференцированных омнипотентных растительных клеток. Из сравнительно молодых каллусных культур путем обработки фитогормонами можно получить нормальные полноценные растения.

СУСПЕНЗИОННЫЕ КУЛЬТУРЫ. Подобно микроорганизмам и животным клеткам, растительные клетки можно выращивать в жидкой стерильной питательной среде.

КУЛЬТУРЫ МЕРИСТЕМ. Меристема — это растительные стволовые клетки, которые обладают способностью к неограниченному делению. Их выделяют в стерильных условиях в виде вегетативных конусов из побегов, корней или пазушных почек и культивируют как каллусную или суспензионную культуру. Если

меристемные клетки подвергнуть тепловой обработке при 40 °С, можно с высокой эффективностью получать культуры, а затем регенерировать молодые растения, свободные от патогенов и вирусов. Однако эти растения не обладают устойчивостью к возбудителям заболеваний и могут быть заново заражены. Меристемные культуры из виноградной лозы, земляники, картофеля, а также из декоративных растений — гвоздики, лилии и хризантемы — обеспечили значительный прогресс садоводческой практики. Объем мирового рынка меристемных культур составляет примерно 3 млрд долл. США.

ГАПЛОИДНЫЕ КУЛЬТУРЫ — это культуры клеток половых органов растений, прежде всего микроспор (пыльцы, тычинок) и мегаспор (яйцеклеток). После культивирования клеток в поверхностной культуре из них можно регенерировать неспособное к воспроизведению гаплоидное растение, содержащее только один набор хромосом. В присутствии ингибитора митоза колхицина или в результате слияния протопластов можно регенерировать гомозиготное диплоидное растение. Для садовода такие растения представляют большой интерес, так как в последующих поколениях они имеют точно такие же признаки. В настоящее время используют гаплоидные культуры картофеля, ячменя, рапса, табака и лекарственных растений.

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ (СИ). При культивировании растительных клеток иногда происходят случайные генетические изменения — точечные мутации, потери генов или хромосомные перестройки. Все это может приводить к появлению как желательных, так и нежелательных изменений. На основе СИ были получены некоторые сорта томата, картофеля и сахарного тростника.

Получение и регенерация меристемной культуры



Влияние растительных гормонов

Питательный агар	Эксплант	Каллус	Корни	Побеги	Нет роста
Ауксин	–	3,00 мг/л	3,00 мг/л	0,03 мг/л	–
Цитокинин	–	0,2 мг/л	0,02 мг/л	1,00 мг/л	0,2 мг/л

Составу	Функция*
Ауксин 3-Индолилуксусная кислота, (2,4-дихлорфенокси)уксусная кислота (синтетический ауксин) и другие	Индукцирует рост в длину, в больших концентрациях ингибирует образование корней и деление клеток
Цитокинины Кинетин, 6-бензаминопурин Абсцизовая кислота Гибберелин и другие	Стимулирует образование каллуса Стимулирует дифференцировку Стимулирует деление клеток и рост в длину

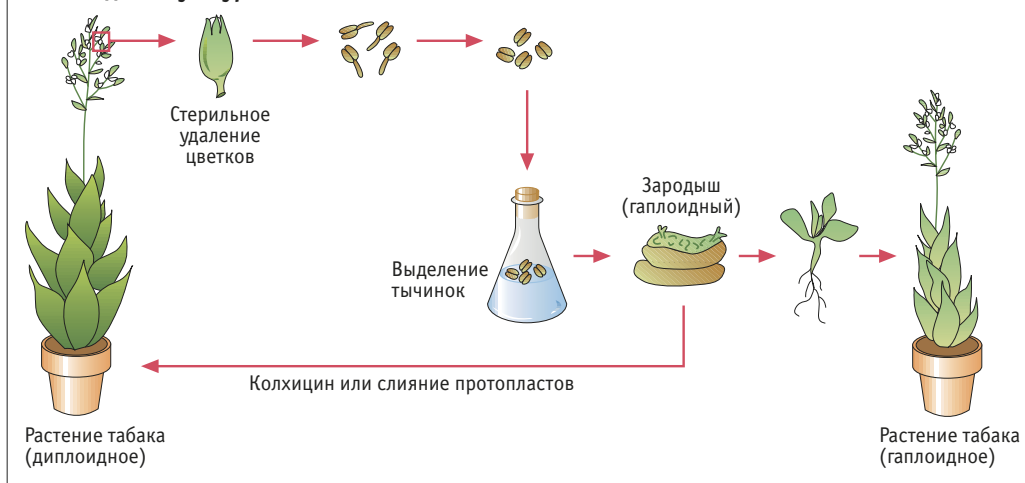
* Ауксин: образование каллуса. Цитокинин: незначительное деление клеток

Безвирусные растения, полученные из меристемной культуры*

Исключен вирус		Исключен вирус	
Томаты	Вирус аспермии томата	Хризантема	Вирус В хризантем, stunt-вириод хризантем
Клубника	Неповирус и др.		

* В большинстве случаев с меристемными культурами работают при 40 °С

Гаплоидные культуры



Культивирование растительных клеток: суспензионные культуры

ВВЕДЕНИЕ. Растительные клетки, подобно микроорганизмам или клеткам животных, могут расти в стерильных жидких средах (суспензионные культуры) при подаче воздуха в присутствии соответствующих фитогормонов. При высаживании таких клеток на твердую питательную среду можно получить эмбриониды, из которых вырастают новые растения. Суспензионные культуры растительных клеток применяют: 1) для быстрого скрининга и отбора вариантов, обладающих особыми свойствами; 2) для получения культур протопластов и трансгенных растений; 3) для получения вторичных метаболитов в биореакторах.

МЕТОДЫ. Растительные клетки переносят из штаммовой или каллусной культуры в жидкую питательную среду, где они растут в присутствии источников углерода и азота, минеральных веществ и растительных гормонов. Для культивирования суспензионных культур используют качалочные колбы, размер которых может достигать нескольких кубических метров — в случае биореакторов с целью получения вторичных метаболитов.

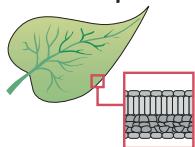
СУСПЕНЗИОННЫЕ КУЛЬТУРЫ. Суспензионные культуры идеально подходят для поиска организмов, обладающих новыми признаками (например, устойчивостью к повышенной концентрации солей, большей устойчивостью к гербицидам, способностью синтезировать новые вторичные метаболиты). Такой скрининг осуществляется гораздо быстрее классических методов с одновременным анализом семян, поэтому он широко применяется, например, при работе с соевыми бобами, цитрусовыми, сахарным тростником, кукурузой, пшеницей и картофелем, прежде всего для получения гибридов растений, устойчивых к стрессу и патогенам. Недостаток такого подхода заключается в появлении нежелательных мутантов: это затрудняет регенерацию нормальных растений из культуры клеток, кроме того, они не всегда обладают искомыми признаками. Суспензионные культуры используют также для получения трансгенных растений, при этом необходимые модификации достигаются не скрещиванием и селекцией, а направленным переносом генов.

КУЛЬТУРЫ ПРОТОПЛАСТОВ. Протопласты получают из клеток тканей или культур путем мягкого гидролиза полисахаридных клеточных стенок целлюлазами, гемицеллюлазами и пектиназами в изотоническом растворе. Слияние протопластов можно осуществлять химическими методами или под действием электрического поля. В результате происходит рекомбинация генов в соматических гибридах. Если слить протопласты с не содержащими ядер цитопластами, можно перенести передающиеся по наследству признаки из органелл. Этот метод успешно используется для переноса фактора цитоплазматической мужской сте-

рильности, которая имеет большое значение для селекции, поскольку гарантирует успех перекрестного оплодотворения. Процесс слияния протопластов, полученных от разных растений, хорошо изучен (томаты и картофель — томофель), однако таким способом пока не удалось получить новые сорта.

БИОРЕАКТОРЫ С РАСТИТЕЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ. Способность растительных клеток расти в виде генетически омнипотентной культуры позволила использовать их как источник ценного сырья. Так, в промышленных масштабах получают вторичные метаболиты, например шиконин, берберин или таксол. Использование растительных клеток для проведения одноступенчатых ферментативных реакций, например гликозилирования или гидроксиглирования, не находит широкого применения, так как такие реакции значительно проще осуществлять с использованием микроорганизмов. Для получения вторичных метаболитов растительные клетки, обработанные растительными гормонами, переносят из каллусной культуры в суспензионную культуру, постепенно увеличивая ее объем в биореакторе. Используются самые разные типы биореакторов: реакторы с механическим перемешиванием, эрлифтные реакторы, барботажные колонны и др. Техническое обслуживание биореактора, как правило, не представляет большой сложности, однако серьезные проблемы связаны с нестабильностью высокопродуктивных линий клеток. Процесс биосинтеза и его регуляция для большинства вторичных продуктов обмена веществ еще не изучен.

Слияние протопластов



Получение протопластов (ферментативное разрушение клеточной стенки)



Культура протопластов

P



Протопласты или цитопласты другой клеточной линии



Регенерация клеточной стенки, каллусная культура



Каллусная культура гибридного растения

P Слияние протопластов при обработке полиэтиленгликолем или при электропорации

Суспензионная культура для селекции



Эксплантат



Каллус



Клеточная культура

Погибшие колонии

Устойчивые колонии

Факторы стресса: соль, гербициды, фитотоксины, химикаты

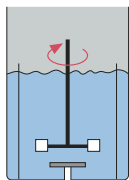


Отбор устойчивых растений

Повышение концентрации соли

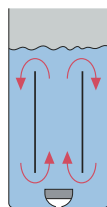
Типы биореакторов для растительных клеток

Реактор с механическим перемешиванием



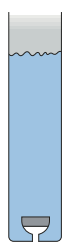
Воздух

Эрлифтный реактор



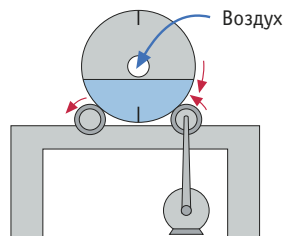
Воздух

Барботажная колонна



Воздух

Ферментер с вращающимся барабаном



Воздух

Растение	Продукт	Применение	Масштаб производства, выход продукта
<i>Digitalis lanata</i>	Метилдигоксин из метилдигитоксина (12β-гидроксигирование)	Лечение сердечно-сосудистых заболеваний	Эрлифтный биореактор 300 л, полунепрерывный процесс, выход ~ 75% за 40–60 ч
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Шиконин	Косметика	Двустадийная реакция, биореакторы 200 и 750 л, 23 сут.
<i>Berberis sp.</i>	Протоберберин	Фармацевтика	До 1,7 г/л
<i>Panax ginseng</i>	Женьшень	Медицина	Биореактор 30 л
<i>Coleus blumei</i>	Розмариновая кислота	Фармацевтика	—
<i>Taxus spp.</i>	Таксол	Противоопухолевый агент	110 мг/л за 14 сут. – 2 г/кг суспензии клеток
<i>Vanilla planifolia</i>	Ванилин	Ароматизатор	16 мг/л за 45 сут.

Трансгенные растения: методы получения

ВВЕДЕНИЕ. Разработано несколько способов введения чужеродной ДНК в геном растений. Прежде всего, для трансформации двудольных растений, таких как томаты, табак, картофель, горох, фасоль, используют Ti-плазмиду *Agrobacterium tumefaciens*. Для одно- и двудольных растений, которые могут быть регенерированы из протопластов, применяют также методы электропорации или трансформации протопластов. Целые растения можно трансформировать при помощи микроинъекций или биолистики. Для доказательства успешности прохождения трансформации используют репортерные гены или методы ПЦР.

Ti-ПЛАЗМИДЫ. Почвенная бактерия *A. tumefaciens* может инфицировать двудольные растения и вызывать образование корончатого галла – опухолевого разрастания клеток на корнях растений. При этом в растение проникает Ti-плазида (от *англ.* tumor inducing) размером примерно 200 п. н., а ее фрагмент порядка 15–30 п. н., так называемая T-ДНК, интегрирует в хромосомную ДНК растения. Для трансформации двудольных используют модифицированные Ti-плазмиды, которые остаются инфекционными, но не несут генов вирулентности. Помимо гена, который необходимо клонировать, они несут T-ДНК, точки начала репликации для *Escherichia coli* или для какого-либо другого организма-хозяина, с которым легко работать в лабораторных условиях, и репортерного гена. Для трансформации клеток культуры тканей их заражают рекомбинантным штаммом *A. tumefaciens*. Используя орган-специфические промоторы и лидерные последовательности, можно не только встроить T-ДНК в определенное место, обеспечив экспрессию в листьях, корнях, многочисленных внутриклеточных компартментах (например, в хлоропластах или митохондриях), но и сделать экспрессию зависимой от внешних условий, таких как высокая температура, засуха, поражение патогеном, уровень освещенности или режим день/ночь. Для трансформации используют также Ri-плазмиды *A. rhizogenes* (возбудитель «кудрявости корней»). Растительные вирусы, например каулимовирусы или геминивирусы, не используются в качестве векторов, так как в них можно встраивать лишь небольшие фрагменты чужеродной ДНК, как правило, они инфицируют немногие виды растений, и схема их репликации чрезвычайно сложна.

ТРАНСГЕННЫЕ ОДНОДОЛЬНЫЕ РАСТЕНИЯ. Многие однодольные растения (пшеница, ячмень, рис и кукуруза) являются особо ценными сельскохозяйственными культурами, и их генетические модификации представляют большой интерес. Однако на практике не удается трансформировать однодольные растения, за исключением риса и кукурузы, при помощи *A. tumefaciens*. Недавно при введении индукторов для активации участка вирулентности были успешно

трансформированы и другие однодольные. С помощью Ti-плазмид можно трансформировать протопласты однодольных. Возможно также применение других методов, основанных на работе с протопластами: микроинъекции, электропорация и обусловленное липосомами слияние, однако дальнейшая регенерация протопластов в нормальные растения чрезвычайно затруднена. В этом случае для трансформации растительных клеток используют метод биолистики. При этом зародыши растений бомбардируют золотыми или вольфрамовыми микрочастицами, на которых нанесена чужеродная ДНК.

ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА. Для этой очень важной практической цели используют два метода. Как в случае трансгенных животных, при гомологичной рекомбинации можно подавить экспрессию путем встраивания в ген чужеродной нуклеотидной последовательности (*нокаутные* растения). Однако эффективность этого метода при работе с растениями, в отличие от животных, очень мала. Большое распространение получил метод клонирования генамишена в антисмысловой ориентации под контролем соответствующего промотора. В трансформированном растении помимо нормальной смысловой мРНК с клонированного гена синтезируется *антисмысловая РНК*, которая образует комплекс с мРНК, и этот комплекс разрушается РНКазами как нефункциональный. В данном случае речь идет о статистическом процессе, происходящем с вероятностью 1–2%.

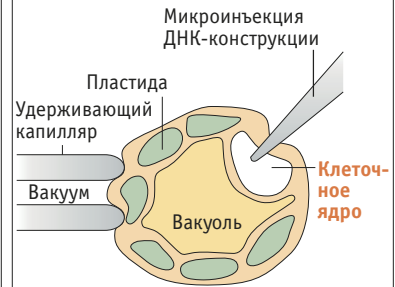
ГЕНОМ РАСТЕНИЙ. К настоящему времени полностью секвенированы геномы нескольких растений (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* – рис). Активно исследуются геномы кукурузы, табака, хлопка, пшеницы, ячменя, картофеля и других полезных растений.

Методы трансформации

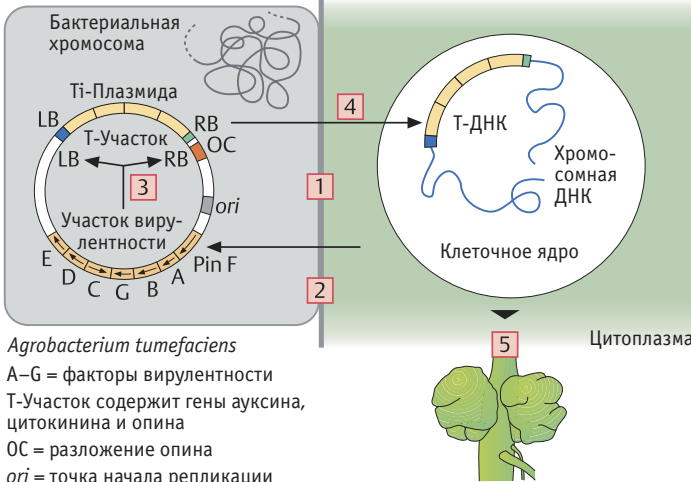
	Однодольные	Двудольные
Микроинъекции (протопласты)	+	+
Трансфекция (протопласты, Ca ²⁺)	0	+
Электропорация (протопласты)	0	+
Биолистика	++	+
Т-ДНК	+	++
Растительные вирусы	0	0

0 – успешна лишь в незначительной степени;
+ возможно; ++ рекомендуемый метод

Микроинъекция



Заражение растения *Agrobacterium tumefaciens*

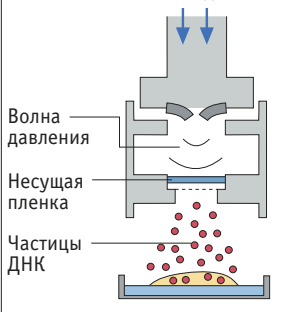
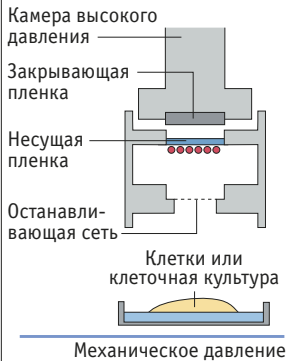


Agrobacterium tumefaciens

A–G = факторы вирулентности
Т-Участок содержит гены ауксина, цитокинина и опина
OC = разложение опина
ori = точка начала репликации

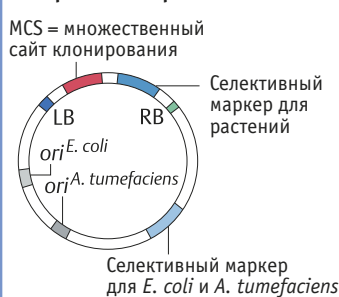
- 1 *A. tumefaciens* прикрепляется к поврежденной растительной клетке
- 2 Растительная клетка синтезирует хемотаксический сигнал и активирует область вирулентности
- 3 Область вирулентности Ti-плазмиды активирует Т-участок
- 4 Т-Участок встраивается в растительную хромосому в виде линейного одноцепочечного участка
- 5 Ауксины и цитокинины инициируют рост опухоли, опин является источником углерода для *A. tumefaciens*

Биолистика

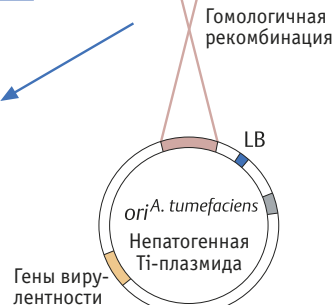
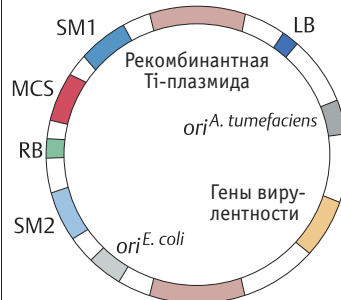
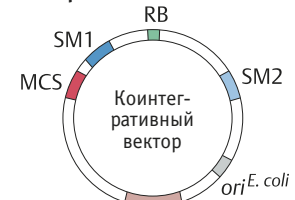


Клонирование вектора на основе *A. tumefaciens*

Бинарный вектор



Система коинтеграционных векторов



Трансгенные растения: устойчивость к неблагоприятным воздействиям

ВВЕДЕНИЕ. В США с 2004 г. разрешено культивировать более 30 трансгенных сельскохозяйственных растений; они занимают площадь более 50 млн га. К ним относятся хлопок, картофель, кукуруза, рапс, соя и томаты. Чаще всего сельскохозяйственные трансгенные растения содержат клонированные гены, обеспечивающие устойчивость к гербицидам, инсектицидам или вирусам. Не так давно появились трансгенные растения с повышенной засухоустойчивостью и с измененной окраской цветков.

РАСТЕНИЯ, УСТОЙЧИВЫЕ К ГЕРБИЦИДАМ. Примерно 10% мирового урожая теряется из-за наличия сорняков. Идеальный гербицид должен действовать в незначительных концентрациях, не оказывать отрицательного влияния на рост культурного растения, быстро разлагаться и не попадать в грунтовые воды. Трансгенные растения, устойчивые к гербицидам, либо содержат в большом количестве гербицид-чувствительный белок, благодаря чему гербицид связывается хуже или совсем не взаимодействует со своей мишенью, либо инактивируют гербицид, разлагая его. Например, соевые бобы, устойчивые к глифосату (Roundup™), были получены в результате выделения гена 5-О-енолпирувиллицимат-3-фосфат-синтазы (EPSP-синтаза является мишенью гербицида) из устойчивых к глифосату штаммов *Escherichia coli* и его последующего клонирования под контролем растительного промотора. Устойчивость к фосфинотрицину (Basta™) — ингибитору глутаминсинтазы — является следствием клонирования гена фосфинотрицинацетилтрансферазы (PAT) из *Streptomyces hygroscopicus* в табаке, картофеле, рапсе и других растениях.

РАСТЕНИЯ, УСТОЙЧИВЫЕ К ДЕЙСТВИЮ НАСЕКОМЫХ. *Bacillus thuringiensis* синтезирует белок с молекулярной массой 250 кДа (δ -эндотоксин, ВТ-токсин), который превращается в высокоактивный токсин в результате протеолиза в кишечнике насекомого. В растениях или в кишечнике млекопитающих такого превращения не происходит, поэтому ВТ-токсин используют в качестве яда для насекомых во множестве видов сельскохозяйственных растений. За счет оптимизации кодонов и использования более сильно конститутивного промотора, например 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, можно увеличить уровень экспрессии белка примерно в 100 раз. Другой пример ядов против насекомых — специфические ингибиторы протеаз.

РАСТЕНИЯ, УСТОЙЧИВЫЕ К ГРИБКОВЫМ ИНФЕКЦИЯМ. Заражение грибами приводит к значительным потерям урожая. В качестве интересного исторического примера можно привести картофельную гниль (*Phytophthora infestans*), которая в XIX в. стала причиной голода в Европе, в частности в Ирландии.

С помощью экспрессии хитиназы или глюканазы, способных разрушать клеточную стенку грибов, удалось получить растение табака, устойчивое к грибковой инфекции. Экспрессия белка, инактивирующего рибосомы грибов (RIP), также обеспечивает устойчивость растения к грибам.

РАСТЕНИЯ, УСТОЙЧИВЫЕ К ДЕЙСТВИЮ ВИРУСОВ. Картофельный вирус 4 и вирус сахарной свеклы rhizomania наносят большой вред сельскому хозяйству. Поэтому осуществляются попытки вмешаться в механизм репликации вируса путем экспрессии нефункциональных вирусных белков (перекрестная защита), а также экспрессировать антитела к вирусам или рибозимам типа «головки молотка».

РАСТЕНИЯ С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СТРЕССУ. Многие разновидности физиологического стресса (яркий свет, ультрафиолетовое излучение, жара или засуха) вызывают образование кислородных радикалов, прежде всего анион-радикалов кислорода. Трансгенные растения, несущие ген фермента супероксиддисмутазы под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, становятся не только устойчивыми к физиологическим стрессам, но и медленнее увядают.

ИЗМЕНЕНИЕ ОКРАСКИ ЦВЕТКОВ, СТАРЕНИЕ. Для декоративных растений важны цвет и форма, для плодовых — возможность длительного хранения и аромат. На эти свойства можно влиять путем встраивания чужеродного гена или выключения существующего. Для получения измененного пигмента, чаще всего флавоноид- и антоциангликозида, и для расширения генетического потенциала используют гены, обеспечивающие синтез вторичных метаболитов из других растений. В качестве примера можно привести «синюю розу», в которой экспрессируется P450-монооксигеназа и образуется синий пигмент. Для выключения генов используют антисмысловые РНК: этот подход был успешно применен при создании томатов «Флавр-Савр».

Трансгенные растения, имеющие хозяйственную ценность (примеры)

Растение	Сверхэкспрессирующийся/чужеродный/измененный/инактивированный ген	Желаемое свойство	Метод трансформации	Производитель/рабочая группа
Хлопчатник	Ацетолактатсинтаза	Устойчивость к сульфонилкарбамиду		DuPont
		Устойчивость к червю – вредителю хлопчатника		Monsanto
Кукуруза	ВТ-δ-эндотоксин	Устойчивость к кукурузной огневке		Monsanto
	Глутаминсинтаза, транс-ацетилаза, EPSP-синтаза	Устойчивость к фосфинотрицину и глифосату		Bayer, Novartis, Monsanto
	ВТ-δ-эндотоксин, EPSP-синтаза	Устойчивость к кукурузной огневке и глифосату		Monsanto
Соя	Глутаминсинтаза, транс-ацетилаза, EPSP-синтаза	Устойчивость к фосфинотрицину и глифосату		Bayer, Novartis, Monsanto
Картофель	ВТ-δ-эндотоксин	Устойчивость к колорадскому жуку		Monsanto
	Полифенолоксидаза	Неспособность к потемнению	Антисмысловая конструкция	Bayer, Novartis, Monsanto
Папайя		Устойчивость к вирусу кольцевой пятнистости папайи		Корнельский университет/Гавайский университет
Томат	Полигалактуроназа	Замедленное созревание	Антисмысловая конструкция	Monsanto «Flavr Savr™»
		Более толстая кожа плода, замедленное созревание		Zeneca
	Монеллин	Высокая сахаристость	Ti-плазмида	
Петуния	Дигидрокемпферолредуктаза из кукурузы	Лепестки с белыми пятнами		Институт исследований селекции растений общества Макса Планка
Роза	Дигидрокверцетин-5'-гидролаза	Синяя окраска		Suntory/Florigene

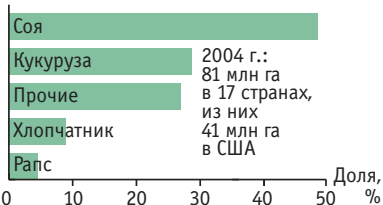
Заболевания корнеплода сахарной свеклы



Устойчивость за счет экспрессии гена белка вирусного капсида

Растения, погибшие от вируса ризомании

Площади, занятые под посевы трансгенных растений



Около 50% всех трансгенных растений с устойчивостью к гербицидам

Устойчивые к фосфинотрицину растения сои



Растение слева устойчиво к гербициду фосфинотрицину (Basta) за счет экспрессии гена фосфинотрицинацетилазы из *Streptomyces hygroscopicus*

Синяя роза



Трансгенные растения

ВВЕДЕНИЕ. Изменение растений генно-инженерными методами преследует цель не только модификации их собственных веществ («растительного сырья»), но и синтеза ценных веществ в растениях. Например: 1) может происходить изменение аминокислотного состава, изменение содержания крахмала и масел (жиров), а в древесине — лигнина; 2) синтез чужеродных (для растения) веществ, таких как антитела или их фрагменты, вакцины, сывороточный альбумин человека или биополимеры.

МОДИФИКАЦИЯ СОБСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТЕНИЯ.

Восполнение в растительных белках недостатка незаменимых аминокислот (преимущественно L-лизина и L-метионина) осуществляется несколькими вполне эффективными путями: а) экспрессией генов более выгодных в этом отношении белков из других растений; б) сайт-направленным мутагенезом генов этих белков для внедрения незаменимых аминокислот вместо заменимых; в) встраиванием генов, которые контролируют синтез необходимых белков (например, генов аспартаткиназы из *Escherichia coli* и синтазы дегидродипиколиновой кислоты из *Corynebacterium* для повышения выхода в синтезе L-лизина). Другой задачей является изменение содержания и состава крахмала. Активность АДФ-глюкозопирофосфорилазы, ключевого фермента в биосинтезе крахмала, регулируется во многих растениях аллостерически. Путем встраивания нерегулируемого гена из *E. coli* удается получить томаты с содержанием крахмала выше на ~20%. Отношение содержания линейной формы (амилозы) к разветвленной (амилопектину) определяет использование крахмала в пищевых или технических целях. Повышение уровня экспрессии гена *glgB* из *E. coli*, контролирующего образование α -1,6-связей между мономерами крахмала, в присутствии промотора гена синтазы гранулированного крахмала, у картофеля приводит к накоплению крахмала с повышенным почти на 25% содержанием амилопектина. Состав жирных кислот в масличных культурах также может быть изменен. Например, лауриновая кислота (C₁₂), очень важный компонент для получения растворимых в холодной воде детергентов, в большом количестве содержится только в маслах тропических растений (в кокосовой и других пальмах) в форме триглицеридов. Путем встраивания гена специфичной к длине углеродной цепи АСР-эстеразы жирных кислот из лавра (*Umbellularia californica*) (или иным способом) в высокопродуктивные селекционные линии рапса удается получить трансгенные растения, которые содержат в семенах до 50 моль % трилауроилглицерина. Содержание лигнина в древесине удается понизить путем модификации генов ферментов, участвующих в биосинтезе (стадии образования промежуточного метаболита — коричной кислоты).

ПОЛУЧЕНИЕ ЧУЖЕРОДНЫХ ДЛЯ РАСТЕНИЯ ВЕЩЕСТВ.

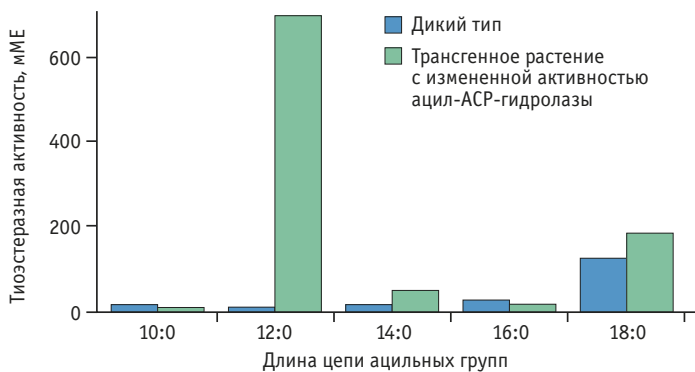
Большинство исследований в этой области проводят на растениях табака или *Arabidopsis thaliana*, которые особенно легко подвергаются трансформации. Так, возможна экспрессия гена человеческого сывороточного альбумина, а также получение IgG-антител, которые используются в профилактике кариеса против адгезина *Streptococcus mutans*. Общая концентрация целевых белков может достигать 1%. Дешевый метод получения антигенов в растениях открывает дорогу вакцинации населения в развивающихся странах путем приема пищи. В модельных экспериментах удалось добиться того, что поверхностные антигены вируса гепатита В в табаке составили 0,01% содержания всех растворимых белков, и добавление порошка из трансгенного табака к рациону мышей приводило к развитию у них иммунного ответа. Потребление картофеля, содержащего энтеротоксин В из *E. coli*, также вызывает иммунный ответ у человека. Экспрессия оперона *Alcaligenes eutrophus*, состоящего из трех генов и ответственного за синтез полигидроксibuтиратов, в хлоропластах *Arabidopsis thaliana* или рапса дает возможность получать этот способный к биодegradации пластик дешевым путем при фотосинтезе. С экономической точки зрения такой синтез этого биополимера все же нуждается в дальнейшем усовершенствовании.

Томатная паста

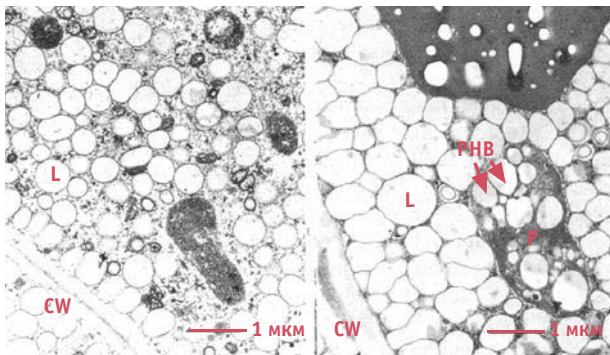


Из томатов повышенной сахаристости

Трансгенный рапс с измененным содержанием жирных кислот



Полигидроксимасляная кислота в пластидах трансгенного рапса



- CW = Клеточная стенка
- P = Пластида
- PHB = Полигидроксимасляная кислота
- L = Липиды

Растения как биореакторы (примеры)

Растение	Чужеродный/измененный или инактивированный ген	Наблюдаемые изменения свойств	Метод трансформации
<i>Модификация собственных соединений растения</i>			
Рапс, соя	Аспартокиназа (<i>E. coli</i>) и синтаза дигидродипиколиновой кислоты (<i>Corynebacterium</i>)	Повышенное содержание L-лизина	Ti-плазмида
Картофель, томат	Крахмал-синтетаза	Другой состав крахмала	Антисмысловая конструкция
Рапс	Ацил-АСР-гидролаза	Другой состав жирных кислот	Ti-плазмида
Резуховидка	γ -Токоферолметилаза	Синтез витамина E	Ti-плазмида
Ель	Синтаза шикимовой кислоты	Пониженное содержание лигнина	Антисмысловая конструкция
<i>Экспрессия чужеродных соединений</i>			Выход продукта, г/кг
Картофель	Белок оболочки вируса гепатита В	Иммунный ответ у мышей	
	Сывороточный альбумин человека	Синтез сывороточного альбумина человека	
Табак	Фрагмент IgG к адгезину вируса бешенства, <i>Bacillus anthrax</i>	Синтез фрагментов антител	10
Рапс, резуховидка	Три гена (<i>phb</i> -оперон) из <i>Alcaligenes eutrophus</i>	Синтез полигидроксibuтирата (ПГБ, или англ. PHB) или полигидроксивалерата (ПГВ, или англ. PHV)	140

Трансгенное растение

Оперон для PHV

Урожай

Обработка

До 140 г/кг «фитополимеров»

Вирусы

ВВЕДЕНИЕ. Вирусы не обладают собственным обменом веществ. Репликация генетического материала вирусов – ДНК или РНК – происходит с помощью клеток-хозяев. Вне клетки-хозяина вирус представляет собой нуклеиновую кислоту, одетую белковой оболочкой (капсидом). Такое состояние вируса называется нуклеокапсидом или вирионом. Вирусы могут инфицировать большинство живых организмов, однако они проявляют высокую специфичность по отношению к клеткам-хозяевам, выбирая определенные ткани или клетки в организме. Существует несколько способов классификации вирусов: по типам клеток-хозяев, по морфологическим признакам, по генетическому материалу (ДНК или РНК) или по строению капсида. Вирусы широко используются в биотехнологии для получения многокомпонентных вакцин, а также для разработки различных векторов, например, для генной терапии или для экспрессии генов в культурах клеток.

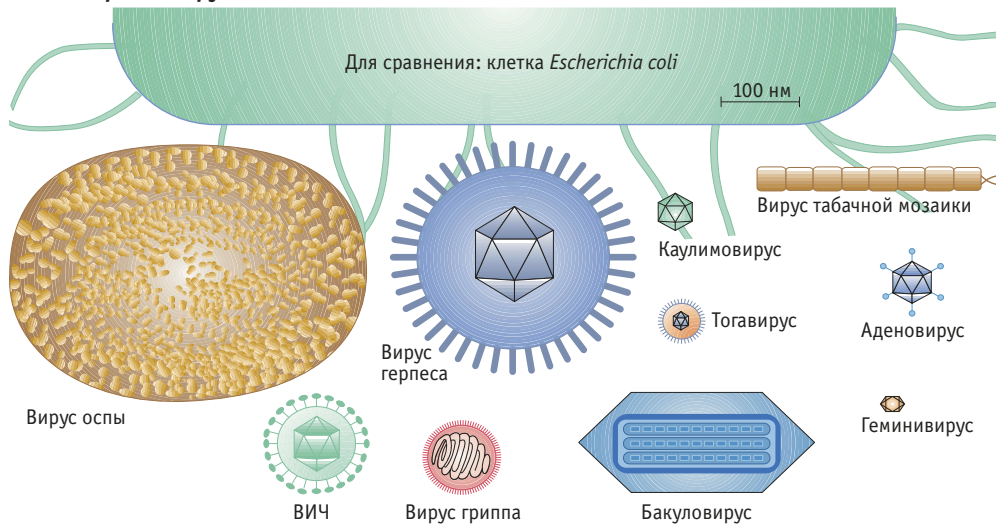
ВИРУСЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ЖИВОТНЫМИ. Первые эксперименты по клонированию животных клеток были проведены в 1979 г. с использованием вектора на основе вируса обезьян (SV40). Вирус проникает в клетку, а затем его развитие протекает по литическому или лизогенному пути. Геном вируса (5,2 т.п.н.) содержит так называемые «ранние гены», кодирующие белки, необходимые для репликации ДНК, и «поздние гены», продукты которых участвуют в синтезе капсида. Векторы на основе SV40 содержат вирусные регуляторные элементы: точку начала репликации, промоторный участок, а также терминатор транскрипции (сайт полиаденилирования). Для трансфекции клеток мышей используют конструкции на основе папилломавируса крупного рогатого скота (BPV). При инфекции они ведут себя как высококопийные плазмиды, и ДНК-копии передаются при клеточном делении дочерним клеткам. Ослабленные ретровирусы, аденовирусы, а также вирус герпеса применяются для генной терапии. Геном ретровирусов (например, ВИЧ) представляет собой РНК. Ретровирусы инфицируют делящиеся клетки, при этом обратная транскриптаза, кодированная в вирусном геноме, обеспечивает синтез кДНК-копии вирусного РНК-генома. Эта кДНК встраивается в геном хозяина и использует его сильные промоторы для синтеза белков капсида и вирусной мРНК. В экспериментальной генной терапии успешно используются ретровирусы с дефектами репликации, однако размер ДНК, доставляемой с помощью вируса, невелик. В отличие от ретровирусов аденовирусы могут быть использованы для упаковки крупных молекул ДНК (до 28 т.п.н.). Аденовирусы инфицируют как делящиеся, так и неделящиеся клетки, однако их ДНК не встраивается в геном хозяина. Известен случай, когда использование аденовирусов вызвало неожиданную

иммунную реакцию и привело к смерти 18-летнего пациента. С тех пор использование аденовирусов в медицине практически прекращено. В настоящее время изучается возможность использования векторов на основе вируса простого герпеса *Herpes simplex* для генной терапии таких нервных расстройств, как болезни Паркинсона или Альцгеймера. Вирус *Herpes simplex* обладает большим ДНК-геномом (152 т.п.н.), следовательно, в него можно встраивать крупные фрагменты ДНК.

ВИРУСЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С РАСТЕНИЯМИ. Большинство вирусов растений имеют РНК-геном. Известны лишь две группы ДНК-содержащих вирусов, которые могут инфицировать высшие растения. У каулимовирусов спектр клеток-хозяев очень узкий: они поражают только представителей семейства крестоцветных – свеклу и некоторые сорта капусты. Каулимовирусы имеют очень маленький капсид, поэтому их собственный геном и чужеродная упакованная ДНК очень невелики. Геминивирусы инфицируют такие важные сельскохозяйственные культуры, как кукуруза и пшеница, поэтому их использование сопряжено с высокой степенью риска. Кроме того, при инфекции в геноме геминивирусов происходят множественные перестройки, в том числе и делеции ДНК, поэтому часто возникают проблемы с экспрессией встроенных фрагментов ДНК.

БАКУЛОВИРУСЫ. Эти вирусы заражают насекомых, но безопасны для позвоночных. В результате вирусной инфекции в клетке начинается синтез кристаллического белка полигедрина (полиэдрина), а синтез более половины белков клетки-хозяина подавляется. Промотор полигедрина используется при создании векторов для гетерологичной экспрессии в клеточной культуре *Spodoptera* (род бабочек). Премущество заключается в том, что посттрансляционное гликозилирование в такой системе аналогично таковому у позвоночных. В настоящее время перечисленные системы экспрессии используются только в лабораторных исследованиях.

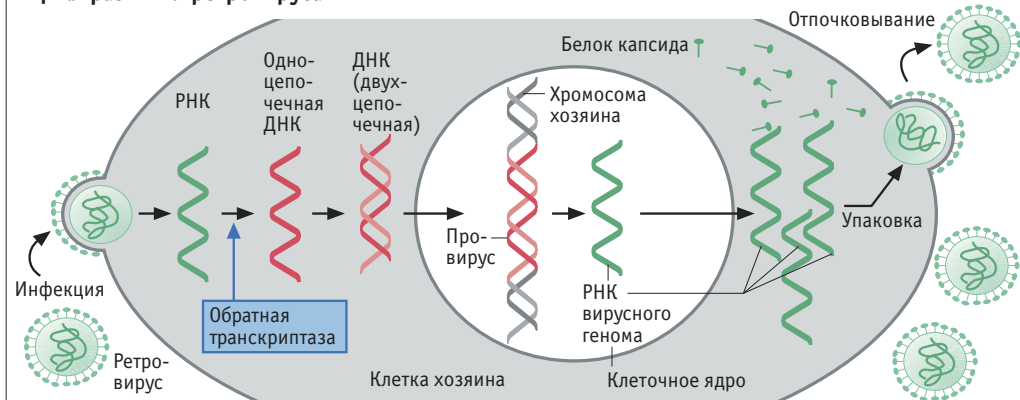
Многообразие вирусов



Вирус	Организм-хозяин	Заболевание, вызываемое вирусной инфекцией	Оболочка	Геном
Вирус оспы	Человек, домашние животные	Оспа	Сложная оболочка	Линейная ДНК, д
Вирус гепатита В	Человек	Гепатит В	Полиэдрический капсид	Кольцевая ДНК, д
Тогавирус	Человек	Корь	Полиэдрический капсид	(+)-РНК, о
Вирус герпеса	Человек, птицы	Опоясывающий лишай и др.	Полиэдрический капсид, наружная оболочка	Линейная ДНК, д
ВИЧ (вирус иммунодефицита человека)	Человек, приматы	СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита)	Сферическая оболочка	2 × (+)-РНК, о
Вирус гриппа	Человек, млекопитающие	Грипп	Спиралевидный, с внешней оболочкой	(-)-РНК, сегментированная
Аденовирус	Человек	Простуда	Полиэдрический капсид	Линейная ДНК, д
Папилломавирус	Скот	Бородавки	Полиэдрический капсид	Кольцевая ДНК, д
Вирус табачной мозаики	Табак		Полиэдрический капсид	РНК, о
Каулимовирус	Капуста		Полиэдрический капсид	Кольцевая ДНК, о
Геминивирус	Двудольные		Двойной полиэдр	Кольцевая ДНК, о
Бакуловирус	Насекомые		Полиэдрический капсид	Кольцевая ДНК, д

о – одноцепочечная, д – двухцепочечная, + – «смысловая» РНК, – – «антисмысловая» РНК

Цикл развития ретровируса



Бактериофаги

ВВЕДЕНИЕ. Бактериофагами (фагами) называются вирусы, которые инфицируют бактерии. Устойчивость к фаговой инфекции – один из важных критериев при получении штаммов-суперпродуцентов. В генетической инженерии бактериофаги используются для получения векторов и промоторов для клонирования, для секвенирования и для создания геномных или белковых библиотек. Чаще всего в качестве клеток-хозяев для клонирования используют клетки *E. coli*, поэтому бактериофаги (фаги λ , M13, Q β , T-фаг), заражающие эти бактерии, вызывают наибольший интерес.

ФАГ λ инфицирует клетки *E. coli*. Как и другие представители умеренных фагов, после заражения фаг λ может развиваться по одному из двух путей: литическому или лизогенному. При литическом росте геном фага, который представлен линейной двунитовой ДНК размером 48,5 т.п.н., многократно реплицируется вне хромосомы хозяина, а затем фаговые частицы высвобождаются из клетки, лизируя ее. Если реализуется лизогенный путь развития фага, его ДНК (размером $\sim 1\%$ хромосомной ДНК *E. coli*) встраивается в геном хозяина и реплицируется вместе с ним. Бактерии, содержащие интегрированный геном фага (профага), называются лизогенными. Повышение температуры, УФ-облучение или другой стресс приводит к высвобождению профага из генома *E. coli* и лизису клетки. В ДНК фага λ имеются так называемые *cos*-сайты – одноцепочечные 5'-концевые участки длиной 12 нуклеотидов, способные к комплементарному взаимодействию. После проникновения фага в клетку *cos*-сайты замыкаются, и образуется кольцевая молекула ДНК, репликация которой происходит по принципу «катящегося кольца». При этом образуются конкатемеры – последовательно соединенные копии фагового генома. Эндонуклеаза А – продукт гена А – расщепляет такую длинную молекулу по *cos*-сайтам, а затем отдельные молекулы фаговой ДНК пакуются в капсиды. На основе фага λ сконструировано множество векторов: например, космиды, используемые при создании геномных библиотек, или семейство λ -векторов, в которое входит вектор λ EMBL4, индукция генов которого происходит при повышении температуры.

ФАГ M13 также инфицирует клетки *E. coli*, однако по строению этот вирус значительно отличается от фага λ . Геном фага M13 представляет собой одну молекулу одноцепочечной ДНК размером 6,4 т.п.н. После проникновения ДНК фага в клетку *E. coli* происходит синтез комплементарной цепи ДНК, и образовавшаяся двухцепочечная фаговая ДНК не встраивается в геном хозяина, а реплицируется в цитоплазме. Затем зрелые одноцепочечные молекулы ДНК фага M13 выходят из клетки, покрываясь

капсидом (~ 1000 фаговых частиц на клетку). Инфицированные клетки при этом не погибают и при делении передают фаговую ДНК дочерним клеткам (~ 100 молекул на клетку). Особенности жизненного цикла бактериофага M13 используются при получении исследуемых генов в виде одноцепочечной ДНК, например для секвенирования ДНК, а также при сайт-направленном мутагенезе с применением ПЦР.

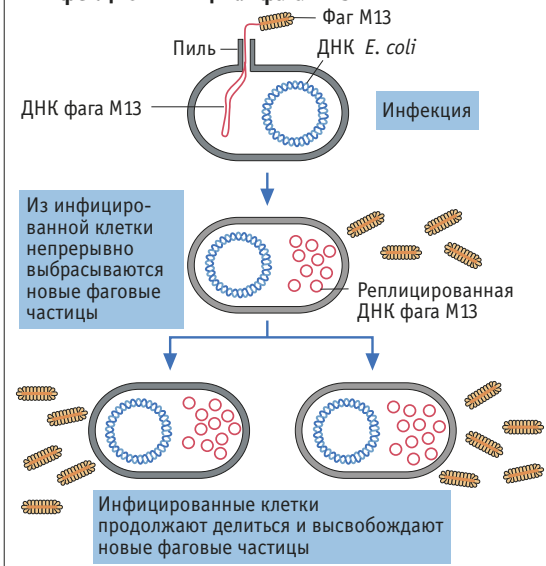
T-ФАГИ разделены на семь типов. В генетической инженерии широко используются два фермента, кодированные в геноме T-фагов: ДНК-лигаза фага T4 – фермент, соединяющий «липкие» и «тупые» концы двух фрагментов ДНК, и ДНК-полимераза фага T7, применяющаяся для секвенирования ДНК по методу Сэнгера–Коулсона. Промотор РНК-полимеразы фага T7 часто встраивают в векторы для экспрессии белков в клетках *E. coli*.

ФАГИ ДРУГИХ БАКТЕРИЙ. Среди более чем тысячи охарактеризованных фагов более 300 инфицируют энтеробактерии, 230 заражают бактериококки, а 150 – актиномицеты и бациллы. Для представителей рода *Pseudomonas* описаны более 100, а для бактерий рода *Lactobacillus* – 40 фагов. По строению и физиологии эти вирусы отличаются от фагов, специфических для *E. coli*. При производстве молочных продуктов особенно важна защита от фагов, инфицирующих бактерии рода *Lactobacillus*, так как они могут присутствовать в стартовых культурах. Как правило, стартовые культуры представлены генетически модифицированными штаммами, устойчивыми к фаговой инфекции. Такая устойчивость обусловлена экспрессией белковых продуктов, кодированных в плазмиде. В результате действия этих белков могут нарушаться процессы внедрения вируса в клетку или его репликации. Среди пяти изученных групп вирусов бактерий рода *Bacillus* фаги ϕ 105 и SPO2 широко используются для трансформации, а фаг PBS1 – при построении карты генома *Bacillus subtilis*. Фаг M3112 часто служит для трансформации бактерий рода *Pseudomonas*, а фаги SV1 и ϕ C31 – для введения ДНК в клетки *Streptomyces*.

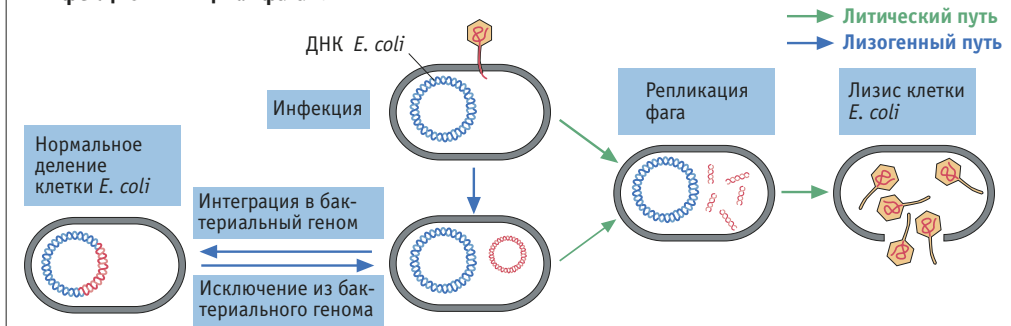
Некоторые фаги *Escherichia coli*

Название и форма фага	Генетический материал
Фаг T2 или T4 Головка фага Воротничок Хвост (ядро, оболочка) Базальная пластинка Нить отростка	ДНК (двухцепочечная)
Фаг λ	ДНК (двухцепочечная)
Фаг M13 6 нм 900 нм	ДНК (одноцепочечная)
Фаг MS2	РНК

Инфекционный цикл фага M13



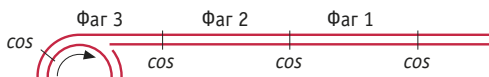
Инфекционный цикл фага λ



Линейная форма ДНК фага λ



Кольцевая форма ДНК фага λ

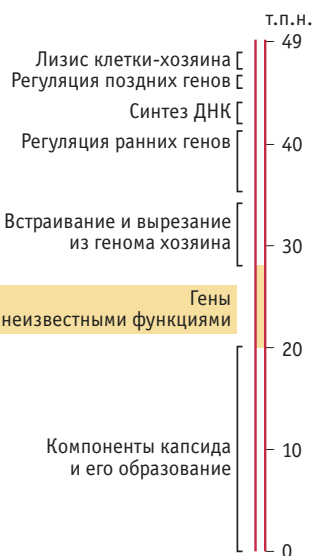


Разворачивание конкатемера из молекул ДНК фага λ

Эндонуклеаза (Δ), закодированная в геноме фага λ, расщепляет конкатемер по *cos*-сайтам

Образование новых фаговых частиц

Генетическая карта фага λ



Микроорганизмы

ВВЕДЕНИЕ. Многие ключевые реакции круговорота веществ в природе осуществляются только микроорганизмами. В частности, микроорганизмам принадлежит ведущая роль в осуществлении процессов распада. Эти процессы особенно важны для высших организмов, поэтому в природе часто имеют место симбиотические отношения между высшими организмами и микроорганизмами. В качестве примеров можно привести лишайники (симбиоз между грибами и водорослями), бактерии в рубце у крупного рогатого скота или кишечную флору млекопитающих. В то же время некоторые микроорганизмы являются возбудителями различных заболеваний. Непатогенные микроорганизмы широко используются в биотехнологии: при получения таких важных продуктов, как лимонная кислота, антибиотики, ксантановые смолы и применяемые в научных и производственных целях ферменты, а также при аэробной или анаэробной очистке сточных вод, воздуха и почвы и в синтезе recombinantных белков. В силу своего относительно простого строения микроорганизмы часто служат в качестве модельных организмов при изучении биохимических, генетических и физиологических процессов. Разработано много методик проведения мутагенеза, и преимущество микроорганизмов для таких экспериментов заключается в их сравнительно коротком жизненном цикле. Раньше классификация микроорганизмов была основана на клеточном строении: их делили на прокариотические и эукариотические; однако согласно современным представлениям, среди прокариот выделены также археи и зубактерии (около 6000 полностью охарактеризованных штаммов).

ЗУБАКТЕРИИ, или истинные бактерии, — это одноклеточные организмы размером около 1 мкм, размножающиеся делением. Как и все прокариоты, зубактерии не имеют клеточного ядра. ДНК зубактерии называется нуклеоидом. Зубактерии часто содержат хромосомные ДНК, например плазмиды, в которых хранится часть генетического материала. Плазмиды могут распространяться в результате горизонтального обмена генами — чрезвычайно важного процесса, обеспечивающего естественную эволюцию метаболизма бактерий, в том числе образование штаммов, устойчивых к антибиотикам. В зависимости от строения клеточной стенки бактерии делятся на грамположительные и грамотрицательные, при этом грамотрицательные бактерии имеют более сложную устроенную клеточную стенку, чем бактерии, окрашивающиеся по методу Грама (грамположительные). Клетки многих бактерий покрыты слизистой оболочкой, а также имеют выросты, позволяющие им передвигаться. В цитоплазме бактериальных клеток могут накапливаться запасные вещества, например поли-

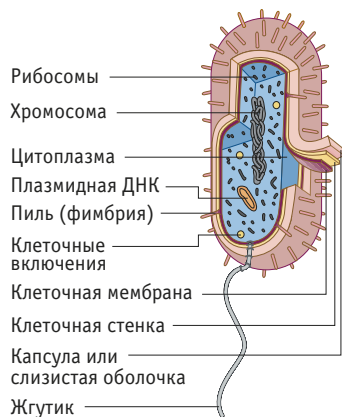
гидроксимасляная кислота или полифосфаты. Благодаря разнообразию обмена веществ представители группы зубактерий встречаются в любой природной среде, этому также способствуют своеобразные пути эволюционирования белков и кофакторов зубактерий. Например, пурпурная мембрана галобактерий обладает некоторыми функциональными свойствами (в том числе способностью к фотосинтезу), позволяющими считать этих бактерий древнейшими предшественниками высших организмов.

АРХЕБАКТЕРИИ (АРХЕИ). Считается, что археи существовали сотни миллионов лет до нашей эры и что это одна из самых древних форм жизни на Земле. Для большинства архей характерен анаэробный обмен веществ (т. е. они могут существовать в отсутствие кислорода), и они часто встречаются в так называемых экстремальных средах. Например, только представители архей осуществляют превращение уксусной кислоты в метан — реакция, лежащая в основе биотехнологической очистки сточных вод. От зубактерий археи отличаются по структурным и генетическим признакам. Например, клеточная стенка архей построена не из фосфолипидов, а из эфиров глицерина. В связи с экстремальными условиями обитания архей их ферменты часто обладают специфическими свойствами, и эти особенности используются в биотехнологии. Так, ДНК-полимераза *Pyrrococcus furiosus*, обитающей в глубоководных озерах, применяется для ПЦР в тех случаях, когда необходима повышенная точность интерполяции нуклеотидов.

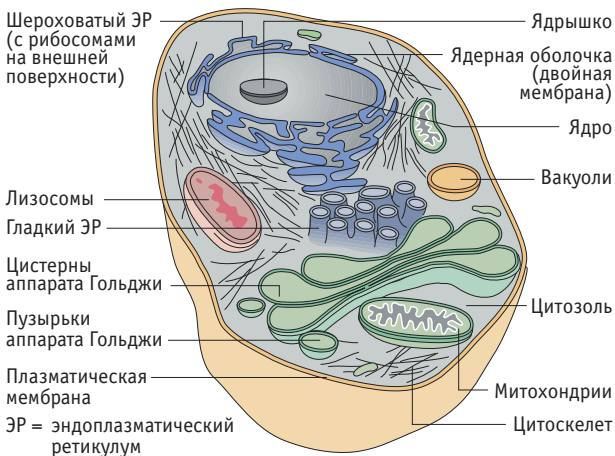
ДРОЖЖИ И ГРИБЫ. Все дрожжи и грибы (около 70 000 штаммов) — эукариоты. В отличие от прокариот их клеточная стенка построена из хитина или, реже, из целлюлозы. Практически все грибы — гетеротрофы и осуществляют аэробное дыхание. В основе классификации грибов лежит способ их размножения. Вегетативное тело грибов (мицелий) состоит из системы ветвящихся нитей (гиф). Наиболее распространено бесполое размножение, которое осуществляется спорами или в результате почкования. Половой процесс у низших грибов (*фикомицетов*) происходит с участием гамет, а у высших грибов для этой цели формируются разнообразные плодовые тела, например сумки у *аскомицетов* или базидии у *базидиомицетов*. Форма плодового тела также признак, используемый при классификации грибов.

Микроорганизмы

Escherichia coli – представитель прокариот

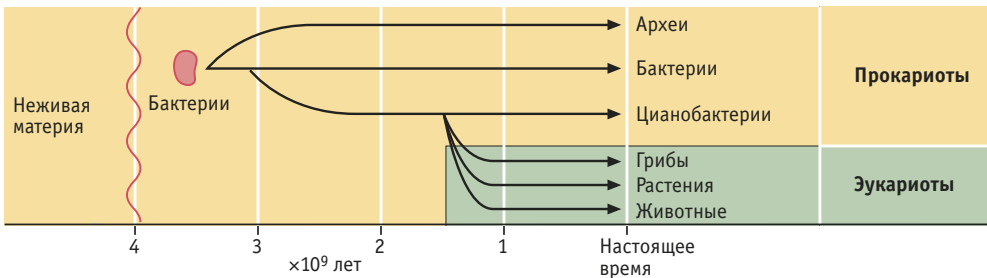


Saccharomyces cerevisiae – представитель эукариот



	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Сравнение животной и растительной клеток
Клеточное ядро, органеллы	Нет	Есть	Есть
Длина клетки, мкм	~ 1	~ 10	100
Объем клетки, мкм ³	~ 1	~ 1000	> 10 000
Дыхание, мкл O ₂ /(мг высушенных клеток · ч)	1000	100	10
Время удвоения, ч	0,3	1,5	> 20
Число генов	~ 4300	~ 6400	> 30 000

Положение микроорганизмов на эволюционном древе



Археи, бактерии и эукариоты (на примере грибов)

	Археи	Эубактерии	Грибы, дрожжи
Тип клетки	Прокариотический	Прокариотический	Эукариотический
Клеточная стенка	Гликопротеин (псевдомуреин) и гетерополисахариды	Пептидогликан (муреин)	Полисахариды (гликаны), хитин
Липиды, входящие в состав клеточной мембраны	Эфиры глицерина и изопреноидного спирта	Фосфолипиды	Фосфолипиды
Инициаторная тРНК	Содержит метионин	Содержит формил-метионин	Содержит метионин
Генетический материал	Небольшая кольцевая хромосома, плазмиды в комплексе с гистоно-подобными белками	Небольшая кольцевая хромосома, плазмиды	Сложное ядро, как минимум, с двумя большими хромосомами в комплексе с гистоновыми белками
РНК-полимераза	Сложное строение	Простое строение	Сложное строение
Размер рибосом	70S	70S	80S

Бактерии

ВВЕДЕНИЕ. Бактерии – группа микроорганизмов, различающихся по множеству морфологических, биохимических и генетических признаков. В связи с этим возможны различные способы классификации бактерий. В настоящее время по коду международной номенклатуры бактерий (ICNB) зарегистрировано около 6 000 штаммов микроорганизмов. Молекулярно-генетический анализ рибосомной РНК из природных сред позволяет предположить, что количество еще не изученных бактерий значительно превышает количество зарегистрированных.

ЗУБАКТЕРИИ. Классическое определение бактерий основывалось на морфологических признаках: даже с помощью светового микроскопа можно различать палочки, кокки, спириллы, объединенные между собой клетки (колонии, филаменты), а также структурные особенности спор и гиф. Для дальнейшей классификации бактерий используется специфическое окрашивание клеток. Реакция клеток на окрашивание по Граму отражает особенности строения клеточной стенки: грамположительные бактерии имеют массивную многослойную клеточную стенку, построенную из муреина, под которой располагается плазматическая мембрана. Клеточное содержимое грамотрицательных бактерий одето внутренней и внешней клеточными мембранами, между которыми находится периплазматическое пространство. Поверх внешней мембраны располагается однослойная клеточная стенка, построенная из муреина и сложных липополисахаридов. Более детальная классификация бактерий возможна при изучении их физиологических и биохимических особенностей. Можно выделить несколько основных критериев для классификации.

Отношение к кислороду: рост бактерий может происходить в аэробных (в присутствии кислорода) или анаэробных (без кислорода) условиях.

Источник энергии: бактерии-фототрофы могут осуществлять фотосинтез, перерабатывая энергию солнечного света, а бактерии-хемотрофы используют в качестве источника энергии различные органические или неорганические соединения, осуществляя дыхание или брожение.

Природа окисляемого соединения. В соответствии с этим критерием выделяются органотрофы (для которых источником энергии служат органические соединения) и литотрофы, получающие энергию за счет окисления таких неорганических веществ, как H_2 , NH_3 , H_2S , S , CO , Fe^{2+} и т. д.

Источник углерода. Автотрофные бактерии фиксируют CO_2 , а гетеротрофные для получения углерода используют органические соединения.

Тип взаимоотношений с другими организмами. По типу взаимоотношений с другими организмами выделяют сапрофитный (автономный) или пара-

зитический (зависящий от организма-хозяина) образ жизни бактерий. Подверженность фаговой инфекции определенного типа также может служить в качестве признака для классификации бактерий (*phage typing*).

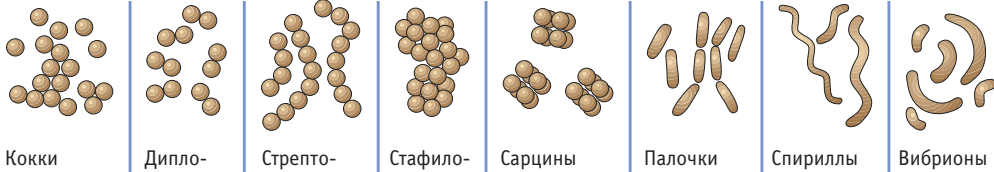
Приспособленность к условиям среды обитания.

В то время как мезофильные бактерии обитают в умеренных условиях, другие бактерии (экстремофилы) приспособились к существованию в экстремальных условиях (температура, давление, pH, концентрация солей и т. д.). Признаки для дальнейшей классификации бактерий можно обнаружить при изучении пигментации, анализе химических компонентов клеточной стенки и клеточной мембраны (состав жирных кислот), данных иммунологического анализа поверхностных антигенов (серология) или устойчивости к действию антибиотиков. В последнее время особенно широко применяется анализ генетических признаков. Первичные данные для классификации можно получить из анализа состава ДНК (содержание G + C). Число бактерий, геном которых полностью секвенирован, постоянно увеличивается, и полученная информация используется при объяснении результатов анализа генетических признаков. С 1972 г. для классификации и установления эволюционных связей между различными бактериями используют результаты секвенирования рибосомных РНК, прежде всего 16S- и 23S-рРНК. В этих молекулах выделяются высококонсервативные участки, сохранившиеся в процессе эволюции. В соответствии со структурой рРНК все живые организмы делятся на три основных надцарства: археи, зубактерии (прокариоты) и эукариоты.

ХАРАКТЕРИСТИКА И ТАКСОНОМИЯ БАКТЕРИИ. Быстрая и достоверная идентификация микроорганизмов имеет большое значение в клинической медицине, ветеринарной практике, пищевой промышленности и лабораторных исследованиях. Наряду с визуальным (с помощью микроскопа) и биохимическим анализом микроорганизма, изучают его способность расти на различных питательных средах, а также проводят анализ ДНК, например, используя ДНК-зонды, специфичные для определенных таксонов.

Не всегда по полученным результатам можно отнести исследуемый штамм к тому или иному таксону, и в таких случаях требуется тщательный анализ более широкого набора признаков.

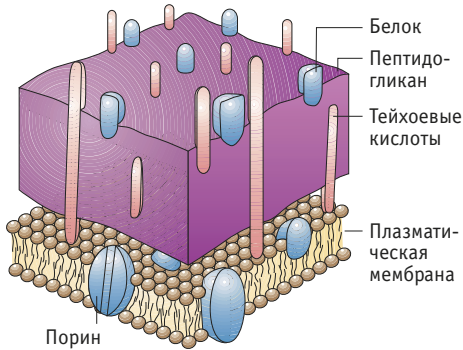
Многообразие форм бактериальных клеток



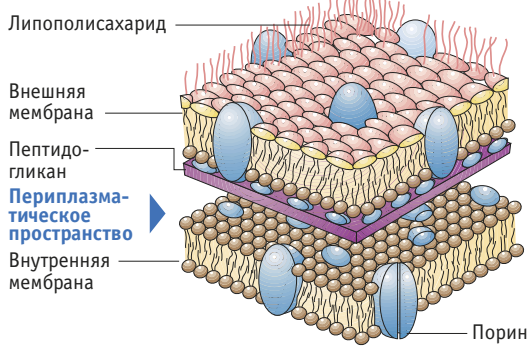
Кокки Дипло-кокки Стрепто-кокки Стафило-кокки Сарцины Палочки Спириллы Вибрионы

Строение клеточной стенки и окрашивание по Граму

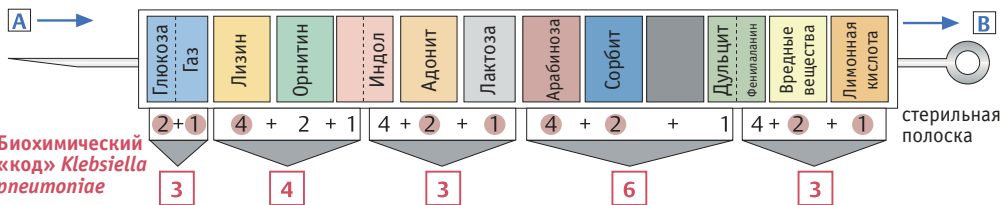
Грамположительные бактерии



Грамтрицательные бактерии



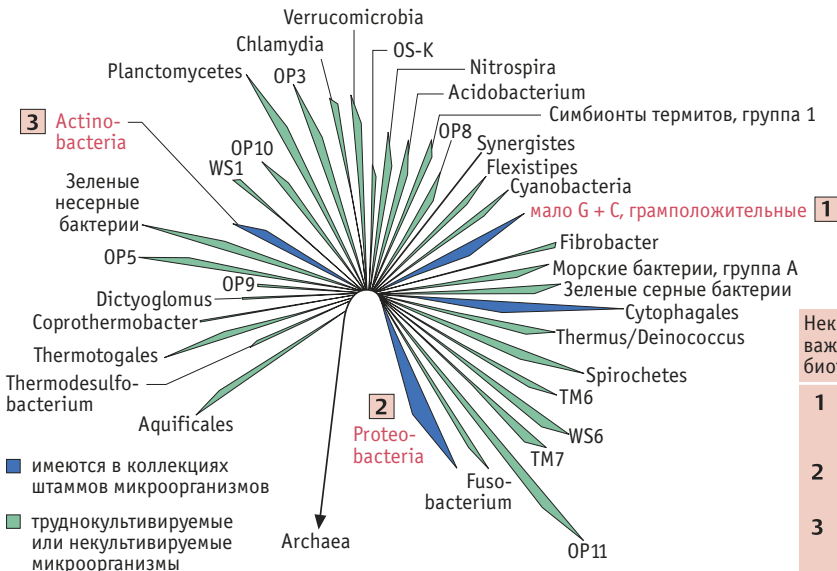
Определение биохимических свойств, характерных для определенного микроорганизма



Биохимический «код» *Klebsiella pneumoniae*

Цветная реакция после погружения полоски в клиническую пробу **A**, извлечения **B** и инкубации в течение некоторого времени

Филогения бактерий и возможность их культивации



Некоторые бактерии, важные для биотехнологии:

- 1 Бациллы, кластридии, лактобактерии
- 2 *E. coli*, псевдомонады
- 3 Стрептомицеты, коринебактерии

Некоторые бактерии, важные для биотехнологии

ВВЕДЕНИЕ. В качестве примеров бактерий, имеющих особенно важное биотехнологическое применение, мы рассмотрим следующие: *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor* и *Corynebacterium glutamicum*.

ESCHERICHIA COLI — представитель кишечной флоры млекопитающих и принадлежит к группе энтеробактерий. Палочкообразные клетки имеют жгутики. *E. coli* — грамотрицательная бактерия, следовательно, под клеточной стенкой располагаются внешняя и внутренняя клеточные мембраны, разделенные периплазматическим пространством. В анаэробных условиях *E. coli* получает энергию в процессе брожения, а при наличии кислорода — с помощью дыхания. В оптимальных аэробных условиях продолжительность жизненного цикла (время между образованием клетки и ее делением) составляет около 20 мин. Геном *E. coli* имеет размер 4,6 млн п.н., и содержание GC-пар 51%. Несмотря на то что геном *E. coli* полностью секвенирован, и эта бактерия является одним из наиболее хорошо изученных микроорганизмов, в настоящее время известны функции лишь двух третей ее белков. В биотехнологии клетки *E. coli* используют для экспрессии негликозилированных белков, например инсулина, гормонов роста и фрагментов антител. Дикие штаммы *E. coli* относятся к «условно патогенным», так как обитают в кишечнике человека, поэтому в лабораторных экспериментах обычно используют ослабленные штаммы *E. coli* (например, *E. coli* K12), не представляющие угрозы для исследователей. Эти штаммы соответствуют группе безопасности S1, и их можно культивировать при соблюдении техники безопасности при обычных микробиологических экспериментах. Для клонирования чужеродной ДНК в *E. coli* используют различные векторы. В качестве примера мы выбрали ВАС-вектор, который наиболее часто применяют при создании генных библиотек (см. рисунок).

PSEUDOMONAS PUTIDA. Клетки *P. putida* — прямые палочки с полярными жгутиками. Это аэробные бактерии, обитающие в воде. Клетки не окрашиваются по Граму, т. е. под клеточной стенкой находятся две мембраны, а между ними — периплазматическое пространство. Размер генома *P. putida* составляет 6,1 млн п.н., содержание GC-пар — 61%. Бактерии *P. putida* имеют особенно важное значение при биотехнологической очистке окружающей среды, так как они способны разлагать труднорастворяющиеся вещества, в том числе ароматические соединения. Такое свойство обусловлено наличием в клетках бактерии так называемых плазмид деградации.

BACILLUS SUBTILIS (сенная палочка) — аэробная почвенная бактерия. Клетки имеют форму палочек без жгутиков. При неблагоприятных условиях в клетках

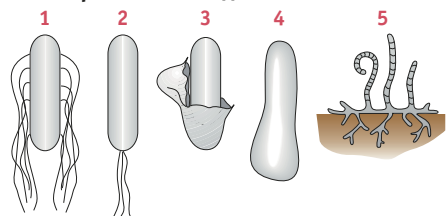
B. subtilis формируются споры, устойчивые к изменениям температуры. *B. subtilis* относится к грамположительным бактериям, следовательно, под клеточной стенкой находится одна клеточная мембрана. Энергию бактерии получают в результате дыхания. В оптимальных условиях продолжительность жизненного цикла составляет около 20 мин. Геном *B. subtilis* имеет размер 4,2 млн п.н. и к настоящему времени он полностью секвенирован. Содержание оснований G + C составляет 44%. В биотехнологии штаммы *B. Subtilis* используют прежде всего для получения секретируемых ферментов, например протеаз и амилаз.

STREPTOMYCES COELICOLOR — почвенная бактерия, которая относится к группе актиномицетов. Все представители этой группы имеют хорошо развитый мицелий. На поверхности колоний образуется воздушный мицелий (гифы), а на концах гиф формируются споры (конидии). Актиномицеты относятся к грамположительным бактериям, т. е. под клеточной стенкой находится одна клеточная мембрана. Как и другие представители актиномицетов, *S. coelicolor* разрушает такие сложные органические соединения, как целлюлоза и хитин. Геном *S. coelicolor* почти вдвое больше, чем геном *E. coli*, — 8,7 млн п.н., и для него характерно высокое содержание оснований G + C (72%). Секвенирование генома *S. coelicolor* завершено. В результате выявлено почти 8000 структурных генов. Вероятно, такой большой геном содержит информацию для осуществления вторичного обмена веществ, например биосинтеза антибиотиков.

CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM принадлежит к группе коринебактерий. Представители этой группы обитают в самых разнообразных средах, и некоторые являются возбудителями болезней (например, *C. diphtheriae* — возбудитель дифтерии). *C. glutamicum* — аэробные грамположительные бактерии. Клетки имеют булавовидную форму. Геном *C. glutamicum* размером 3,1 млн п.н. полностью секвенирован, содержание оснований G + C составляет 56%. Мутантные штаммы *C. glutamicum* являются важными продуцентами L-глутаминовой кислоты и L-лизина.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ. К 2005 г. завершено секвенирование геномов более 200 бактерий. Среди них — многие патогенные бактерии, а также археи.

Бактерии, важные для биотехнологии



- 1 *Escherichia coli*
 2 *Pseudomonas putida*
 3 *Bacillus subtilis*
 (выходящая из споры)
 4 *Corynebacterium glutamicum*
 5 *Streptomyces coelicolor*
 (со спорофорами)

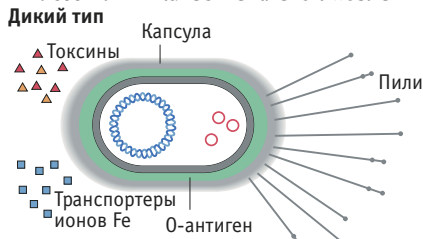
	1	2	3	4	5
Наличие жгутиков	+	+	-	-	-
Окрашивание по Граму	-	-	+	+	+
Образование спор	-	-	+	-	+
Рост в аэробных условиях	+	+	+	+	
GC-состав	51	61	44	56	72
Размер генома (млн п.н.)	4,6	4,2	4,2	3,1	8,7

Белки, кодируемые в геноме *E. coli* K12

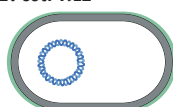
Всего	4288	Белки с неизвестными функциями*	1632
Транспортные белки, ответственные за связывание	288	Предполагаемые регуляторные белки	133
Предполагаемые транспортные белки	146	Белки, необходимые для репликации и модификации ДНК	115
Предполагаемые ферменты	251	Белки-кофакторы и простетические группы	103
Белки, участвующие в энергетическом цикле клетки	243	Белки фагов и транспозонов, а также белки, кодируемые в плазмидной ДНК	87
Белки адаптации, защиты от неблагоприятных условий	188	Белки-участники метаболизма нуклеотидов	58
Белки, участвующие во внутриклеточной сигнализации	188	Белки, необходимые для транскрипции и синтеза РНК	55
Белки структурных элементов клетки	182	Белки – участники метаболизма жирных кислот и фосфолипидов	48
Предполагаемые структурные белки	42	Регуляторные белки	45
Белки, необходимые для трансляции и посттрансляционной модификации	182	Белки с другими установленными функциями	26
Белки – участники метаболизма аминокислот	131	Предполагаемые мембранные белки	13
Белки – участники катаболизма углерода	130	Предполагаемые шапероны	9

* По результатам секвенирования генома на 1997 г. К настоящему времени установлена роль многих белков *E. coli* с ранее неизвестными функциями

E. coli K12 в качестве клеток-хозяев

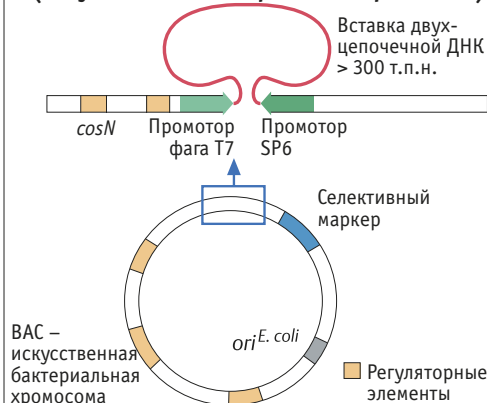


E. coli K12



- уменьшенный геном
- нет плазмид
- нет капсулы
- нет пилей
- редуцирован O-антиген
- нет токсинов
- нет транспортеров ионов Fe

ВАС-вектор клонирования (искусственная бактериальная хромосома)



Некоторые прокариотические организмы, геном которых полностью секвенирован

	Заболевание	Размер генома, млн п.н.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Пневмония и менингит у детей	1,8
<i>Helicobacter pylori</i>	Язвенные заболевания	1,7
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Воспаление легких	0,8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Туберкулез	4,4
<i>Treponema pallidum</i>	Сифилис	1,1
<i>Mycobacterium leprae</i>	Проказа	3,3

Грибы

ВВЕДЕНИЕ. Грибам принадлежит важная роль в круговороте веществ в природе, в частности они участвуют в разрушении древесины и образовании гумуса. В симбиозе с высшими растениями (*микоризы*) грибы помогают им перерабатывать различные вещества. В то же время некоторые представители грибов являются опасными патогенами растений (например, мучнистая роса). В биотехнологии грибы используют в производстве пищевых продуктов, при получении антибиотиков и ферментов; при утилизации биомассы важную роль играет способность грибов осуществлять разложение органических соединений. Среди 70 000 видов охарактеризованных грибов наиболее широко представлены сумчатые грибы аскомицеты (около 20 000 видов). В качестве примеров здесь рассмотрены *Penicillium notatum* и *Aspergillus niger*. Очень важны в биотехнологии представители фикомицетов – грибы родов *Rhizopus* и *Mucor*. Около 12 000 видов грибов базидиомицетов относятся к съедобным грибам (шампиньоны, лисички, белые грибы и т. д.), а некоторые другие их представители участвуют в разрушении древесины (белый и красный плесневые грибы). Среди грибов встречаются патогенные для человека виды (их около 300). Все грибы – гетеротрофы. Их клеточная стенка содержит хитин, глюкан и в некоторых случаях также целлюлозу.

РАЗМНОЖЕНИЕ ГРИБОВ. Типы размножения грибов чрезвычайно разнообразны, в качестве примера мы рассмотрим размножение сумчатых грибов аскомицетов. Вегетативное тело грибов (*таллом*) состоит из мицелия – системы ветвящихся нитей (*гифы*). При бесполом размножении на концевых выростах мицелия образуются конидиеносцы. В конидиях происходит деление и высвобождение спор, из которых формируется новый мицелий. Как и многие другие грибы, аскомицеты способны к половому размножению. У них существует две различающиеся по облику формы (явление *диморфизма*), что существенно затрудняет их классификацию. Гифы формируют мужские и женские половые органы (*антеридии* и *аскогонии* соответственно); после протекания плазмогамии образуются дикариотические гифы, дающие начало аскокарпу («плодовому телу»). Затем в концевых клетках дикариотических гиф два ядра сливаются и формируют диплоидную зиготу (этот процесс называется *кариогамией*). После *мейоза* образуются восемь *аскоспор* (у аскомицетов) или четыре *базидиоспоры* (у базидиомицетов), из которых в дальнейшем вырастает мицелий.

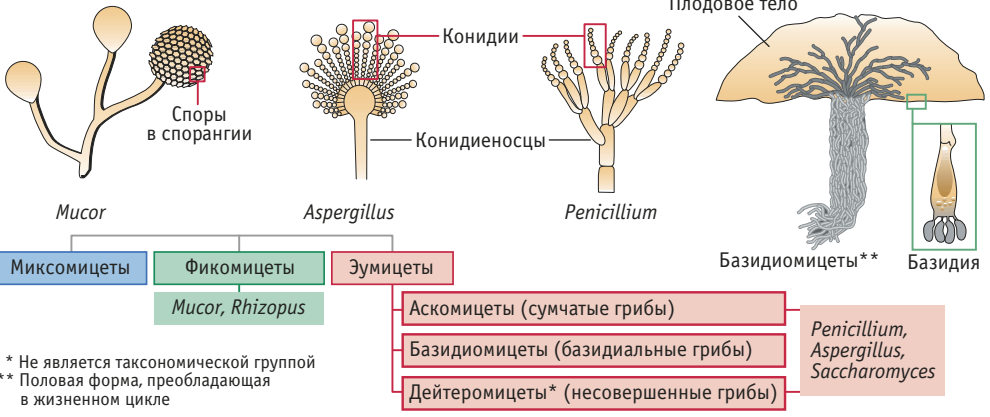
PENICILLIUM NOTATUM растет как мицелий. Он образует плодовые тела с *конидиями*, из которых высвобождаются споры. Внутри асков созревают споры, прорастающие в новый мицелий. Как и другие представители несовершенных грибов, *P. notatum* раз-

множается исключительно бесполым путем, поэтому для осуществления рекомбинации в лабораторных условиях проводят слияние протопластов с различными типами ядер (*гетерокариоз*, парасексуальный процесс). *P. notatum* и родственный гриб *Cephalosporium acremonium* – продуценты важнейших лактамных антибиотиков. Другим примером биотехнологического применения грибов рода *Penicillium* является использование *Penicillium camamberti* при изготовлении сыров. Геном *P. notatum* имеет размер 32 млн п.н., и к настоящему времени секвенирована лишь небольшая его часть.

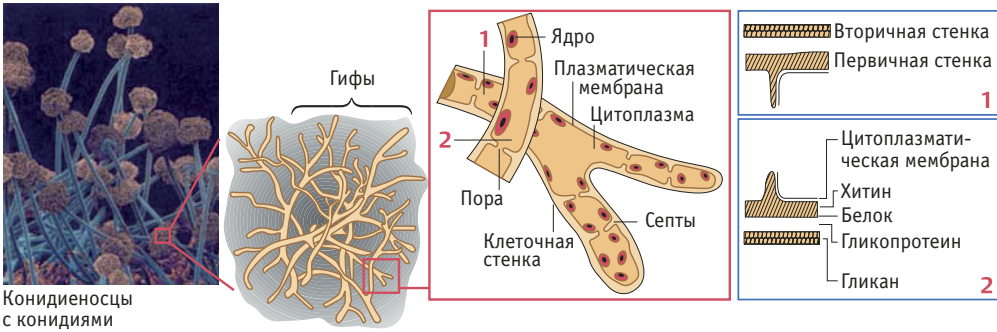
ASPERGILLUS NIDULANS – другой представитель аскомицетов, морфологически отличающийся от *Penicillium* по форме конидий. Размер генома составляет 31 млн п.н. и его структура пока полностью не расшифрована (2005 г.). В биотехнологии штаммы *Aspergillus* находят широкое применение: *A. oryzae* часто служит в качестве организма-хозяина для экспрессии рекомбинантных белков, *A. niger* является промышленным продуцентом лимонной и глюконовой кислот. Другие штаммы *Aspergillus* используются для синтеза внеклеточных ферментов (амилаз и протеиназ), а также в пищевой промышленности (например, в азиатском регионе для приготовления соевого соуса и мисо). Как и в случае *Penicillium*, для усовершенствования штаммов *Aspergillus* проводят слияние протопластов с последующим отбором.

RHIZOPUS ORYZAE и *R. nigricans* – представители фикомицетов, растущие на рисе и хлебе соответственно. Гифы этих грибов растут чрезвычайно быстро и буквально пронизывают питательную среду. Бесполое размножение фикомицетов происходит с образованием спор в специализированном мицелии – *спорангиях*. Представители родов *Rhizopus* и *Mucor* находят широкое применение в биотехнологии, так как в процессе разложения органического субстрата они выделяют в среду разнообразные внеклеточные ферменты. Геном *R. oryzae* составляет около 39 млн п.н., его нуклеотидная последовательность будет определена в ближайшее время (2005 г.).

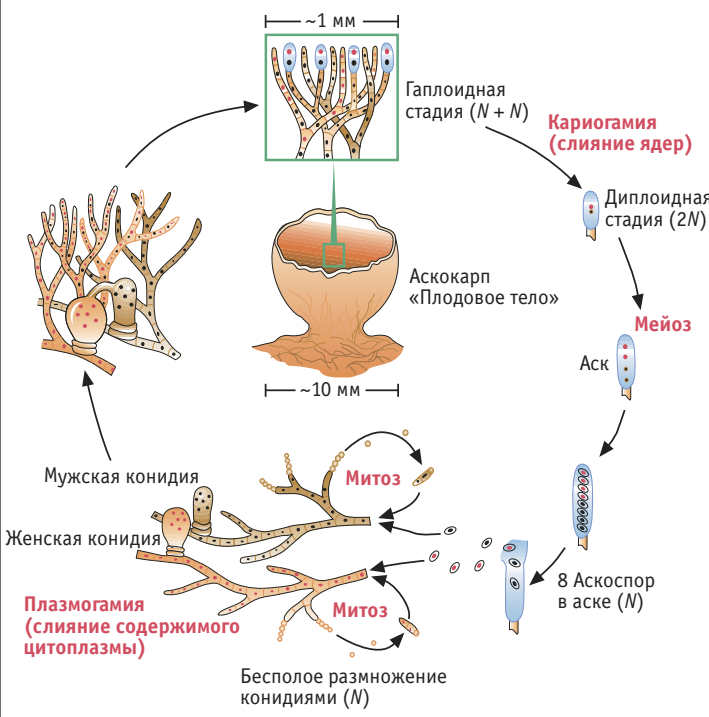
Морфологические признаки некоторых грибов



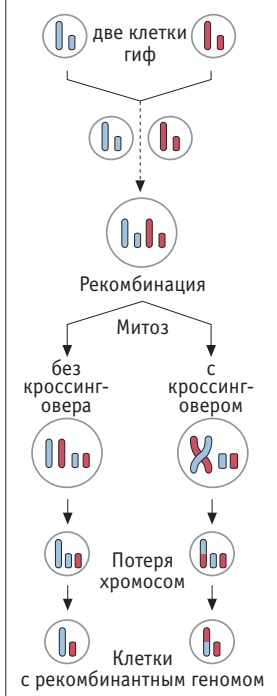
Aspergillus niger – представитель аскомицетов



Репродуктивный цикл аскомицетов



Парасексуальный цикл (на примере Aspergillus)



Дрожжи

ВВЕДЕНИЕ. Дрожжи — это группа грибов, не имеющих типичного мицелия и размножающихся почкованием. К дрожжам относят представителей различных классов грибов. Дрожжи — гетеротрофные организмы, предпочитающие для роста кислые среды (рН 3,5–5,0). Клеточная стенка этих организмов содержит хитин. В биотехнологии наиболее важные следующие дрожжи: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha* и *Pichia pastoris*.

SACCHAROMYCES CEREVISIAE (пекарские дрожжи) могут размножаться как в гаплоидной, так и в диплоидной форме, поэтому они являются излюбленным объектом для генетических исследований. Гаплоидные штаммы, используемые в лабораторной практике, принадлежат одному из двух типов спаривания — МАА или МАТ α . Скрещивание возможно только между представителями разных типов спаривания. Бесполое (вегетативное) размножение осуществляется почкованием гаплоидных или диплоидных клеток. При половом размножении происходит слияние двух гаплоидных клеток, и в результате мейоза образуются четыре гаплоидные аскоспоры. Выводы о генетических изменениях можно делать, исходя из визуального (с помощью микроскопа) анализа аскоспор (тетрадный анализ). Поскольку и в гаплоидной, и в диплоидной формах эти дрожжи — неприхотливая и устойчивая культура, для которой в оптимальных условиях время удвоения составляет всего 90 мин, *S. cerevisiae* — очень ценный объект для молекулярно-генетических экспериментов. Нуклеотидная последовательность генома *S. cerevisiae* полностью расшифрована (12 млн п.н. находятся в 46 хромосомах). Наличие в клетках внехромосомных элементов (2-плазмиды, присутствующей в количестве 60–100 копий на клетку) также является преимуществом этого вида дрожжей, так как открывает новые возможности для осуществления рекомбинации. Для трансформации клеток *S. cerevisiae* разработано множество векторных конструкций: при использовании одних векторов чужеродная ДНК реплицируется в клетке независимо (YRP — yeast replicating plasmid и YEP — yeast episomal plasmid), а другие векторы позволяют чужеродной ДНК встраиваться в дрожжевые хромосомы (YIP — yeast integrating plasmid). Искусственные дрожжевые хромосомы (YAC — yeast artificial chromosome) позволяют клонировать очень крупные фрагменты ДНК (600–1400 т. п. н.), поэтому их часто используют для создания геномных библиотек. Недостатком такой системы является высокая частота внутрихромосомной рекомбинации, поэтому в последнее время искусственные дрожжевые хромосомы все чаще заменяют на бактериальные искусственные хромосомы (BAC). Около 6000 генов *S. cerevisiae*

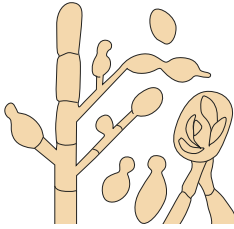
в высокой степени гомологичны генам человека, поэтому эти дрожжи часто служат в качестве модельной системы при изучении молекулярно-биологических механизмов обмена веществ. В биотехнологии они используются в пищевой промышленности, для производства алкогольных напитков, этанола, а также для промышленного получения рекомбинантных белков, например α -интерферона, и различных вакцин, в том числе поверхностного антигена вируса гепатита В. В отличие от систем экспрессии с использованием *E. coli*, в клетках *S. cerevisiae* белки претерпевают посттрансляционную модификацию (например, гликозилирование), поэтому дрожжи используют для получения эукариотических белков, для функционирования которых необходимы такие модификации.

CANDIDA UTILIS — представитель группы дрожжей, который формирует мицелий и размножается исключительно почкованием. В геноме *C. utilis* встречаются неканонические кодоны (например, CUG, обычно кодирующий лейцин, в этом организме кодирует серин), поэтому гетерологическая экспрессия в *C. utilis* крайне затруднена. Штаммы *C. utilis* применяют в биотехнологическом производстве внеклеточных ферментов, а в сельском хозяйстве — как кормовую добавку. Грибы рода *Candida* могут использовать в качестве источника углерода такие необычные вещества, как фракции нефти или сульфитсодержащие производные, поэтому они имеют особенно важное значение при утилизации различных отходов. Некоторые представители рода *Candida* для человека патогенные (*Candida albicans*).

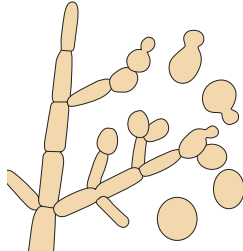
PICHIA PASTORIS И HANSENULA POLYMORPHA — представители метилотрофных дрожжей, использующих в качестве единственного источника углерода метанол. Метилотрофные дрожжи активно изучаются с целью использования для экспрессии эукариотических генов. Так, в клетках *Pichia pastoris* удалось осуществить очень эффективный синтез различных белков: липаз, β -интерферона и фрагментов антител (до 12 г рекомбинантного белка на литр культуры).

SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE впервые были выделены из восточно-африканского пива (пиво на языке суахили — *pombe*). Геном *S. pombe*, распределенный всего между тремя хромосомами, полностью расшифрован: его размер составляет 12,6 млн п.н., что сравнимо с размером генома *S. cerevisiae*, но всего по трем хромосомам, несущим почти по 5000 генов.

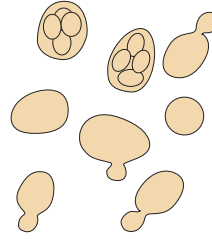
Морфологическое разнообразие дрожжей



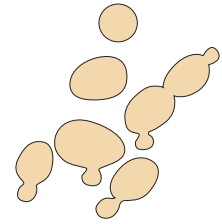
Endomycopsis
Образование асков
Образование мицелия
Почкование



Candida
–
Образование мицелия
Почкование



Saccharomyces
Образование асков
–
Почкование

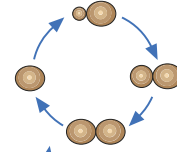


Torulopsis
–
–
Почкование

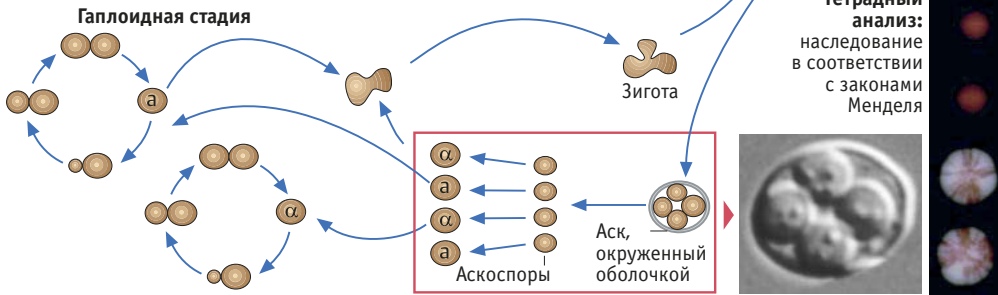
Молекулярная генетика дрожжей

	Размер гаплоидного генома, млн п.н.	Количество хромосом
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15	16
<i>Candida utilis</i>	14–18	8
<i>Pichia pastoris</i>	Неизвестен	6–8
<i>Hansenula polymorpha</i>	Неизвестен	4–6

Диплоидная стадия

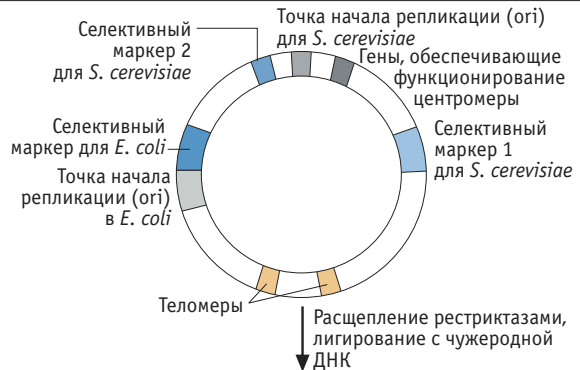
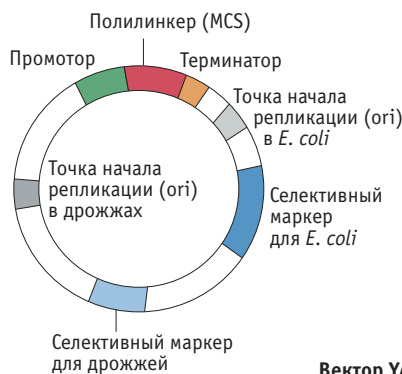


Репродуктивный цикл *Saccharomyces cerevisiae*



Дрожжевые векторы

Вектор YEP (yeast expression plasmid) – дрожжевая экспрессирующая плазмида



Вектор YAC (yeast artificial chromosome) – дрожжевая искусственная хромосома

Вставка чужеродной ДНК (двухцепочечная) > 100 т.п.н.



Микроорганизмы: выделение и хранение штамма. Техника безопасности

ВВЕДЕНИЕ. В научных исследованиях, как правило, используют чистые культуры микроорганизмов. Для биотехнологического применения штаммы усовершенствуют в соответствии с поставленными задачами, осуществляют мутагенез и последующий отбор мутантов. Для сохранения чистых штаммов микроорганизмов создают специальные коллекции. Пересев клеток микроорганизмов на жидкие или твердые питательные среды проводится в стерильных условиях. Большинство используемых в биотехнологии микроорганизмов являются гетеротрофами и культивируются в аэробных условиях. Анаэробные организмы выращивают в бескислородной среде, а для культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов подбирают специальные условия освещенности.

ЧИСТЫЕ МИКРОБНЫЕ КУЛЬТУРЫ хранятся в коллекциях штаммов. Чтобы получить чистую культуру из природной среды обитания (почвы, воды, пищевых продуктов, других организмов), проводят посев штрихом (метод истощающего штриха) на стерильную агаризованную питательную среду (агар — сложный полисахарид, получаемый из морских водорослей). Условия культивирования выбирают так, чтобы выделяемый микроорганизм имел преимущество роста по сравнению с другими микроорганизмами, обитающими в той же природной среде. Например, цианобактерии культивируют в анаэробных условиях на свету, в качестве источника углерода пропускают CO_2 , а в качестве источника азота — N_2 . Для выращивания грибов используют слабокислую, обогащенную сахарами среду, для отбора термофильных микроорганизмов повышают температуру культивирования, а для выделения микроорганизмов-продуцентов протеаз в качестве единственного органического источника азота в среду добавляют казеин. По данным 16S-rPHK-анализа удается выделить лишь 1% всех микроорганизмов, обитающих в воде или почве.

КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ служат для хранения чистых штаммов, обладающих определенными свойствами. Для поддержания штамма в лабораторных условиях его пересевают на агаризованную среду: в пробирку со скошенной средой или на чашку Петри, однако в результате многократного посева может произойти вырождение. По этой причине для сохранения особенно важных штаммов предпочтительнее использовать один из следующих методов: 1) хранение под химически инертной жидкостью, например парафином (рекомендуется для сохранения штаммов гифообразующих грибов); 2) замораживание при -196°C и последующее хранение в жидком азоте или при температуре -70°C . Замораживание и размораживание в этом случае должны происходить очень быстро и в присутствии глицерина, чтобы предотвратить разрушение клеточной стенки образу-

ющимися кристаллами льда. Метод широко применяется для сохранения бактериальных и дрожжевых штаммов; 3) высушивание клеточной суспензии на носителе (силикагеле, песке) в вакууме. Эту операцию проводят в присутствии эмульгаторов (обезжиренное молоко, сыворотка), а полученные препараты хранят при температуре -70°C . Перед помещением в коллекцию необходимо убедиться в том, что клетки не потеряли способности к росту. В настоящее время в большинстве стран созданы богатые коллекции штаммов микроорганизмов, из которых можно получать чистые культуры. Существуют как универсальные коллекции штаммов, например ATCC — американская коллекция штаммов (American Type Culture Collection) или DSMZ — коллекция микроорганизмов и клеток Германии, так и коллекции, специализирующиеся на определенных группах микроорганизмов, например CBS — центральная коллекция плесневых грибов. Многие промышленные предприятия имеют собственные коллекции важных штаммов микроорганизмов.

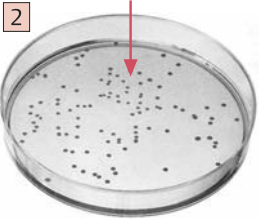
ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ. Почти в любом роде микроорганизмов есть представители, патогенные для человека: например, в биотехнологии *Bacillus subtilis* — непатогенный продуцент ферментов, а вот *Bacillus anthracis* — возбудитель сибирской язвы; *Aspergillus oryzae* используется для приготовления соевого соуса, а *Aspergillus flavus* продуцирует токсичное вещество (афлатоксин), обладающее канцерогенными свойствами. По этой причине при любых операциях с микроорганизмами необходимо строго соблюдать правила техники безопасности при работе с биологическими объектами. В соответствии со степенью риска для пользователя все микроорганизмы разделены на четыре группы. Оборудование лаборатории и правила работы должны соответствовать правилам техники безопасности при работе с микроорганизмами каждой группы. К первой группе риска относятся микроорганизмы, которые традиционно используются для приготовления пищевых продуктов (например, пекарские дрожжи). Подавляющее большинство микроорганизмов, используемых в биотехнологии, также относятся к первой группе.

Чистые культуры

1 Посев штрихом на питательную среду (агар)



Пересев отдельных клонов в жидкую среду, а затем посев на твердую питательную среду

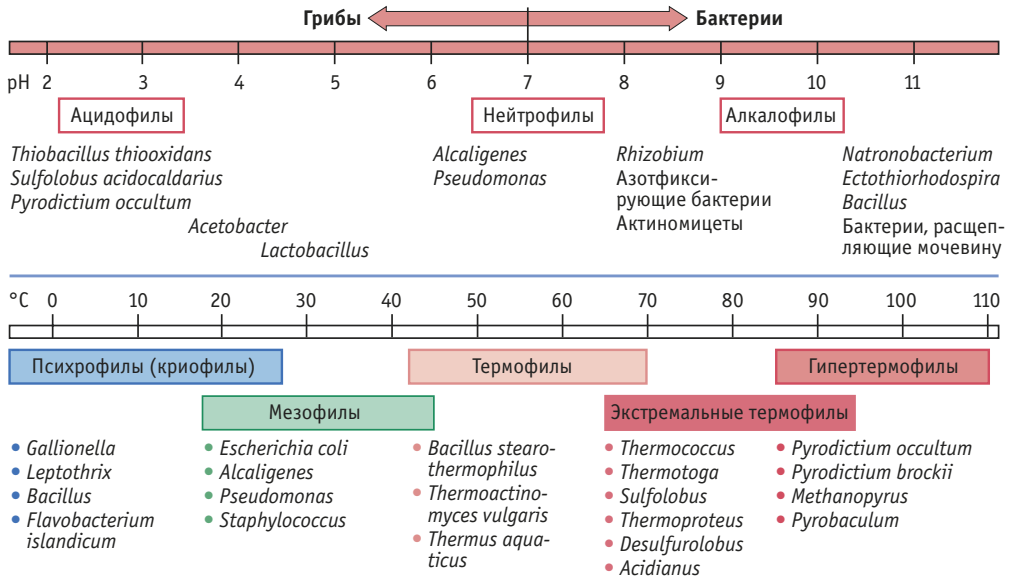


Получение обогащенных культур микроорганизмов

Бактерии	Источник энергии, питательные вещества
Фототрофы	
<i>Rhodospirillen</i>	● Свет, H ₂ или органические кислоты, CO ₂
Цианобактерии	■ Свет, CO ₂ , N ₂ в качестве источника N
Хемолитотрофы	
<i>Nitrosomonas</i>	● NH ₄ ⁺ – донор H, O ₂ – акцептор H
<i>Thiobacillus</i>	● H ₂ S, S или S ₂ O ₃ ²⁻ как акцептор H, орг. кислоты
Метанообразующие бактерии	■ H ₂ как донор H, CO ₂ как акцептор H
Гетеротрофы	
Псевдомонады	■ 2% KNO ₃ как акцептор H, органические кислоты
Клостридии	■ Крахмал, NH ₄ ⁺ , пастеризованный посевной материал
Энтеробактерии	■ Глюкоза, NH ₄ ⁺
Молочнокислые бактерии	■ Глюкоза, дрожжевой экстракт, pH 5
Бациллы	● Крахмал, NH ₄ ⁺
Стрептомицеты	● Маннит, NH ₄ ⁺
Бактерии, используемые для получения некоторых ферментов	
Аэробные бактерии, секретирующие протеиназы	● Глюкоза, NH ₄ ⁺ , казеин
Аэробные бактерии, секретирующие липазы	● Глюкоза, NH ₄ ⁺ , трибутирин

● – аэробные условия ■ – анаэробные условия

Разнообразие сред обитания микроорганизмов



Разделение микроорганизмов на группы в соответствии со степенью риска для человека

Группа 1	Группа 2	Группа 3
<i>Acetobacter acetii</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Yersinia pestis</i>
<i>Penicillium notatum</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>

■ Бактерии ■ Грибы, дрожжи

Усовершенствование штаммов микроорганизмов

ВВЕДЕНИЕ. Микроорганизмы, выделенные из природной среды обитания, редко полностью отвечают требованиям биотехнологического производства. Поэтому необходимым подготовительным этапом является многократное повторение мутагенеза и последующего отбора мутантов, обладающих искомыми свойствами. Наиболее часто задачей таких экспериментов является получение штаммов, продуцирующих больше целевого вещества и меньше побочных продуктов или обладающих лучшими технологическими характеристиками (сокращение времени ферментации, отсутствие нежелательной пигментации, устойчивость к бактериофагам и др.). Одним из преимуществ микроорганизмов является их короткий жизненный цикл (часто менее 1 ч). Это позволяет достаточно быстро получать и анализировать большое количество мутантов. При работе с эукариотическими микроорганизмами (например, грибами) необходимо принимать во внимание процесс рекомбинации. Знание обмена веществ, его регуляции и структуры ДНК, кодирующей ферменты, позволяет модифицировать геном микроорганизмов, целенаправленно «выключая» или «активируя» те или иные стадии обмена веществ (*metabolic engineering*).

МУТАГЕНЕЗ. Вероятность спонтанной мутации в нормальном гене (под действием естественных мутагенов или при репликации) составляет 10^{-6} – 10^{-7} . Как правило, такие мутации остаются «молчаливыми» из-за генетической или функциональной супрессии или становятся мишенью системы репарации ДНК. Для усовершенствования штаммов осуществляют более эффективный искусственный мутагенез: например, при ультрафиолетовом облучении или при введении мутагенных веществ. Путем изменения длительности мутагенного воздействия и путем подбора мутагенных веществ удается варьировать частоту мутаций в клетках. В результате действия мутагенных факторов, как правило, 90–99% клеток погибают, а затем из оставшихся клеток отбирают мутантов, которые обладают желаемыми фенотипическими признаками.

ОТБОР МУТАНТОВ В ПОВЕРХНОСТНЫХ КУЛЬТУРАХ.

Основным фенотипическим признаком, рассматриваемым при усовершенствовании штаммов микроорганизмов, является их способность образовывать большое количество продукта. Для отбора мутантов, удовлетворяющих этому требованию, разрабатывают систему отбора. В качестве признака для отбора может служить устойчивость к антибиотику, ядовитым веществам или фаговой инфекции. Полученные после проведения мутагенеза клетки высевают в чашки Петри на твердые селективные среды, где вырастают лишь те колонии, которые обладают необходимой устойчивостью. Для отбора ауксотрофных мутантов реплики колоний помещают на питательную среду без

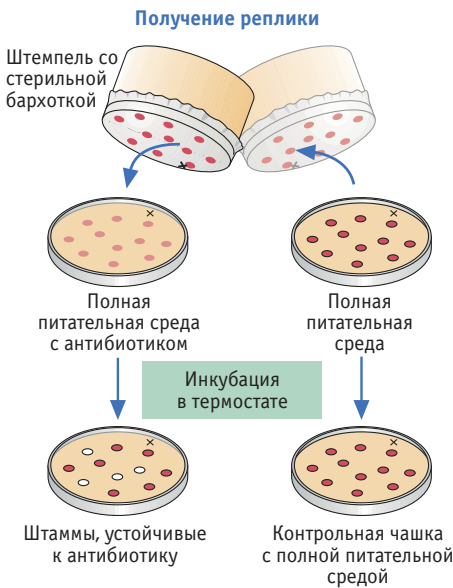
антибиотика и с антибиотиком (например, с пенициллином). Основными преимуществами такого метода является возможность проводить одновременный анализ большого количества полученных мутантов (несколько сотен на одной чашке). В результате действия сильных мутагенных факторов часто происходят изменения в нескольких генах, поэтому необходимо проверить не только способность мутантов образовывать необходимый продукт, но и сохранность свойств, характерных для дикого штамма. Для этого отобранные клетки выращивают в качалочных колбах в условиях, максимально приближенных к таковым в производственном процессе, и отбирают клетки, обладающие улучшенными свойствами. Повторение нескольких раундов мутагенеза с последующим отбором позволяет отобрать штаммы, которые наилучшим образом удовлетворяют всем требованиям технологического процесса. Для устранения ненужных приобретенных свойств полученные штаммы скрещивают с дикими штаммами.

СЕЛЕКЦИЯ В НЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЕ. Отбор мутантов можно проводить в непрерывной культуре в ферментере: для этого клетки микроорганизмов выращивают в среде с мутагеном и осуществляют при этом селективное воздействие, например постепенно заменяют один источник углерода на другой. В таких условиях выживают лишь те микроорганизмы, которые в результате мутагенеза приобрели способность утилизировать новый источник углерода. Описанный способ, однако, не позволяет проводить отбор мутантов с повышенным выходом продукта.

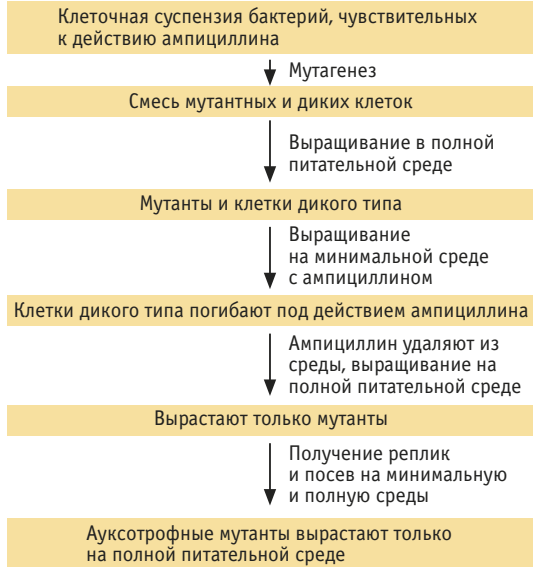
Усовершенствование штаммов микроорганизмов

Мутагенез	Механизм	Тип изменений
Физический метод		
Ионизирующее (рентгеновское) облучение	Образование одно- или двухцепочечных разрывов в ДНК	Устойчивые генетические изменения
Ультрафиолетовое облучение (~254 нм)	Образование димеров тимидина и цитозина	Точечные мутации
Химический метод		
Нитрит	При дезаминировании аденина образуется гипоксантин, а цитозина – урацил	Точечные мутации
Алкилирующие агенты	Алкилированные пурины	Точечные мутации
Аналоги оснований	Включаются в ДНК при репликации	Устойчивые генетические изменения
Акридиновый оранжевый	Интеркалирует в ДНК	Устойчивые генетические изменения
Биологический метод		
Транспозоны	Переносят участки ДНК внутри хромосомы	Маркирование генов

Метод реплик и пенициллиновый метод



Пенициллиновый метод



Селективные питательные среды



* Выводы делают после получения реплик и применения пенициллинового метода

Микроорганизмы: рост в искусственных условиях

ВВЕДЕНИЕ. Микроорганизмы культивируют как на твердых, так и в жидких средах. Для лабораторной работы в первом случае обычно используют чашки с агаризованной питательной средой, во втором — качалочные колбы небольшого объема (обычно до 0,5 л). Культивирование промышленных микроорганизмов осуществляется в биореакторах. Полноценный состав питательной среды, своевременное добавление тех или иных компонентов в процессе роста клеток и оптимальные условия культивирования обеспечивают максимальный выход продукта. Во избежание заражения промышленной культуры другими микроорганизмами все операции по возможности проводятся в стерильных условиях.

КАЧАЛОЧНЫЕ КОЛБЫ используют для культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде. В лабораторной практике широко распространены конические колбы объемом 50–500 мл — колбы Эрленмейера, названные по имени немецкого ученого, впервые применившего колбы такой формы. Специальные перемешивающие платформы, на которые помещают колбы с культурой микроорганизмов, обеспечивают доступ кислорода ко всем клеткам. Для культивирования анаэробных микроорганизмов среду стерилизуют, деаэрируют и все последующие операции проводят в бескислородной среде в присутствии восстанавливающих агентов, например тиогликолята.

БИОРЕАКТОРЫ (ферментеры) имеют объем от 1 л до 500 м³. Чаще используются реакторы с механическим перемешиванием, в которых равномерное распределение кислорода осуществляется с помощью мешалок, благодаря чему пузырьки поступающего воздуха становятся меньше и разносятся по всему объему реактора. В применяемых промышленных биореакторах могут осуществляться процессы ферментации трех типов: периодическая ферментация, периодическая ферментация с добавлением субстрата и непрерывная ферментация. В промышленности, как правило, осуществляют ферментацию первого или второго типа, в то время как непрерывная ферментация имеет большое значение для фундаментальных исследований, так как позволяет поддерживать постоянную концентрацию специфических компонентов среды в течение длительного времени (до нескольких недель). Синтез метаболитов протекает наиболее интенсивно, когда клетки находятся в стационарной фазе, однако к этому моменту часто истощаются ресурсы среды. В то же время рост многих микроорганизмов подавляется при высоких концентрациях глюкозы в среде — так называемое ингибирование избытком субстрата, поэтому с самого начала нельзя добавлять избыток питательных веществ в среду роста. Чтобы избежать замедления роста при избытке субстрата и продлить время продуктивного синтеза, т. е. повысить выход продукта, по окончании фазы роста в среду добавляют новые питательные вещества в концентрированном виде.

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ.

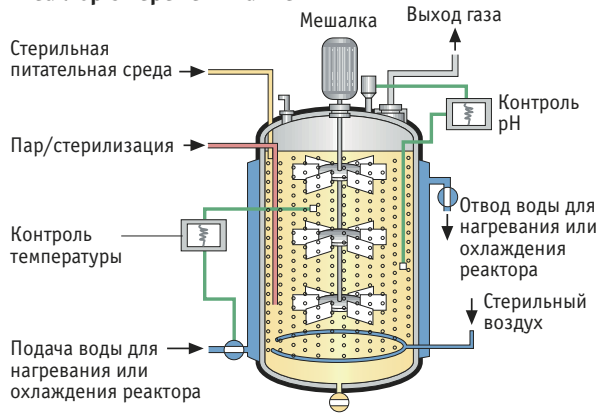
Большинство микроорганизмов, использующихся в промышленности, растут в аэробных условиях и являются гетеротрофами. Для их роста необходимы органические соединения в качестве источника углерода и энергии, а также азот, соли и микроэлементы (например, ионы некоторых переходных металлов и витамины). Подбор оптимального состава питательной среды для каждого микроорганизма проводят при выращивании культуры в качалочных колбах небольшого объема. Важнейшими показателями, определяющими пригодность той или иной среды роста, является выход продукта, а также относительная стоимость сырья, необходимого для ее приготовления. Так, в производстве этанола или лимонной кислоты стоимость сырья составляет более 50% стоимости полученного продукта. Экономически более выгодно использовать в промышленности дешевые натуральные среды, имеющие не очень строго контролируемый состав, такие как кукурузный крахмал, меласса или соевая мука. В лабораторных исследованиях обычно готовят искусственные среды, в которые входят только химически чистые соединения (например, глюкоза и смесь аминокислот) в определенной концентрации.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД. В лабораторных условиях питательные среды стерилизуют главным образом в автоклавах. Споры термофильных бактерий теряют жизнеспособность после 15-минутного прогревания среды при 121 °С (за тестовый организм принят *Bacillus stearothermophilus*). В этих условиях многие питательные вещества, в том числе глюкоза и витамины, нестабильны, поэтому растворы, содержащие эти вещества, стерилизуют фильтрацией через специальные бактериальные фильтры. Промышленную стерилизацию больших объемов питательных сред (более 10 л) ранее осуществляли обработкой паром под давлением 1,4–3 бар. Этот процесс является чрезвычайно продолжительным (для нагревания и охлаждения емкостей требуется несколько часов) и энергоемким. Кроме того, в результате длительной термообработки некоторые компоненты питательной среды претерпевают необратимые изменения. В современной промышленности применяют биореакторы с непрерывной стерилизацией, когда питательная среда нагревается струей перегретого пара до 140 °С в течение 2–3 мин. Противоток пара препятствует образованию конденсата, и при этом экономится до 90% энергии. Подаваемый вместе с паром воздух предварительно очищают пропуская через фильтр, так как 1 м³ воздуха может содержать до 2000 различных штаммов микроорганизмов, среди которых 50% — споры грибов, 40% — грамотрицательные бактерии. Если в биореакторе интенсивность аэрации составляет один объем воздуха на один объем жидкости в минуту, то для стерилизации биореактора с рабочим объемом 100 м³ требуется около 6000 м³ стерильного воздуха в час.

Качалочная колба



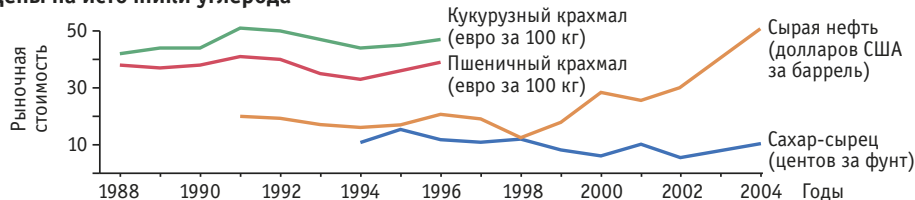
Реактор с перемешиванием



Питательные среды

Компоненты	Источник	Состав/примечания
Многокомпонентные источники углерода		
Меласса сахарной свеклы	Производство сахара	~ 48% сахарозы
Меласса сахарного тростника		~ 33% сахарозы, ~ 22% инвертированного сахара
Экстракты переработки кукурузного сырья	Производство крахмала и патоки	2–3% глюкозы, 11–13% лактозы
Барда	Производство спирта	Различный
Крахмал и декстрины	Кукуруза	Различный
Отработанный щелок (сульфитный щелок)	Целлюлозно-бумажная промышленность	2–4% гексозы и пентозы
Молочная сыворотка	Молочная промышленность	3% лактозы
Углеводороды	Нефтехимия	Алифатические алканы (более пяти атомов углерода)
Однокомпонентные источники углерода (в искусственных питательных средах)		
Глюкоза		Для большинства организмов
Маннит		Для роста стрептомицетов
Метанол		Для роста многих бактерий и дрожжей
Многокомпонентные источники азота		
Соевое молоко, арахисовая мука, пшеничные отруби, экстракты переработки кукурузного сырья, обезжиренное сухое молоко, дрожжевой экстракт		Белок 20-26%, витамины и микроэлементы
Однокомпонентные источники азота		
Соли аммония, нитраты, мочевины, аминокислоты		
Витамины, микроэлементы		
Тиамин, рибофлавин, пиридоксин, никотиновая кислота, амид никотиновой кислоты, пантотеновая кислота, цианокобаламин, фолиевая кислота, биотин, α-липовая кислота, пурины и пиримидины, гемины		
Макроэлементы (10^{-3} – 10^{-4} моль): соли K, Ca, Mg, Fe, S, P		
Микроэлементы (10^{-6} – 10^{-8} моль): соли Mn, Mo, Zn, Cu, Co, Ni, V, B, Cl, Na, Si		

Цены на источники углерода



Кинетика образования продуктов метаболизма и биомассы в культуре микроорганизмов

ВВЕДЕНИЕ. Закономерности клеточного роста достаточно хорошо изучены для одноклеточных микроорганизмов. Грибы и стрептомицеты образуют мицелий, для них значительно сложнее описать процесс роста: по мере их роста увеличиваются число и размеры гиф мицелия. Кинетика образования метаболитов, т. е. типы ферментации, весьма разнообразны.

КИНЕТИКА РОСТА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. К одноклеточным микроорганизмам относятся большинство бактерий, а также дрожжи. Эти организмы размножаются делением. За ростом клеточной массы можно наблюдать с помощью оптических методов, например непрерывно измерять оптическую плотность (поглощение света определенной длины волны) среды. Для клеток, культивируемых в условиях периодической ферментации, выделяют шесть фаз клеточного роста. За лаг-фазой, во время которой происходит адаптация клетки к новым условиям и синтез ферментов, необходимых для роста, следует короткая промежуточная фаза I (фаза ускорения), а затем в течение относительно длительного периода удельная скорость роста клеток остается постоянной. Эта фаза называется экспоненциальной: рост клеток описывается кинетическим уравнением первого порядка. За экспоненциальной фазой следует промежуточная фаза II: замедление клеточного роста происходит из-за истощения питательной среды, накопления токсичных для клетки метаболитов и высокой плотности популяции. Культура переходит в стационарную фазу: в это время число клеток остается постоянным, однако именно в это время может происходить образование важнейших вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков. Завершающая стадия — фаза отмирания — период, когда все процессы метаболизма в клетке останавливаются. Самые важные параметры, которые можно определить по кривой роста: 1) **продолжительность лаг-фазы**, которая зависит от физиологического состояния посевного материала к моменту инокуляции, а также от различия между составом среды, где клетки росли ранее, и составом новой культуральной среды; 2) **удельная скорость роста** (μ^{-1}) связывает скорость роста клеточной массы и концентрацию клеток в реакторе. В экспоненциальной фазе величина постоянна, однако для промежуточной фазы II удельная скорость роста зависит от концентрации лимитирующего субстрата S . Эта зависимость выражается уравнением Моно:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S / (K_S + S),$$
 где K_S (мг/л) — концентрация лимитирующего клеточный рост питательного вещества, при которой удельная скорость вдвое ниже максимального значения. Уравнение Моно имеет ту же форму, что и уравнение скорости ферментативной реакции, предложенное Михаэлисом и Ментен, и является математическим упроще-

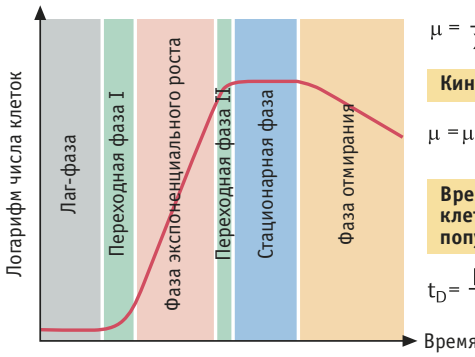
нием при моделировании. Иногда вместо удельной скорости роста используют время генерации или время удвоения — время, за которое происходит удвоение числа клеток в экспоненциальной фазе. Часто оказывается, что количество клеточной массы, образующейся в процессе клеточного роста, пропорционально массе утилизированного клетками субстрата. Экономическим коэффициентом называют соотношение между приростом клеточной массы и потребляемым субстратом, при этом под субстратом в данном случае понимают не только химические вещества (кислород, источники азота и углерода, фосфаты), но и физические параметры, например температуру. Если среда содержит несколько источников углерода, то иногда можно наблюдать ряд последовательных лаг-фаз. Это явление, называемое *диауксией* (*двухфазным ростом*), обусловлено изменением метаболизма в процессе роста: сначала клетки используют один источник углерода, а затем, когда он истощается, «перестраивают» свой метаболизм на утилизацию другого источника.

КИНЕТИКА РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБРАЗУЮЩИХ МИЦЕЛИЙ. Рост грибов, а также прокариот, образующих мицелий, таких как стрептомицеты, сопровождается увеличением размеров мицелия (образующих его гиф). Рост таких организмов описывается очень сложной кинетикой.

ОБРАЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА. Процессы образования продуктов метаболизма могут быть сопряжены или не сопряжены с клеточным ростом. Согласно исторической классификации, процесс ферментации, сопряженный с клеточным ростом, относят к типу I. Примером может служить образование этанола в ходе анаэробного роста дрожжей. При ферментации III типа конечный продукт синтезируется в клетках по окончании экспоненциальной фазы роста и является вторичным метаболитом. В качестве примера можно привести антибиотики и внеклеточные ферменты. Ферментацией II типа ранее называлось образование продукта по «ответвлениям» основных путей первичного метаболизма и, следовательно, без непосредственной связи с энергетическим обменом клетки, как, например, при синтезе лимонной кислоты или аминокислот. Согласно современному представлению, процессы образования всех метаболитов в клетке взаимосвязаны, поэтому сейчас говорят только о ферментации I или III типа, т. е. о ферментации, сопряженной или не сопряженной с клеточным ростом.

Кинетика роста в реакторе периодического действия

Кривая роста культуры



Кинетика роста в экспоненциальной фазе

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \mu = \mu_{\max} = \text{const.}$$

Кинетика роста во время переходной фазы II

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

Уравнение Моно для роста, ограниченного количеством субстрата

Время удвоения клеточной популяции

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Время генерации

$$t_G = \frac{\ln 2}{v}$$

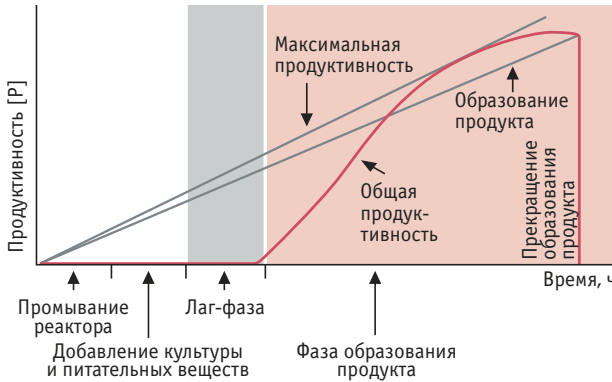
Скорость деления клеток

$$v = \frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt}$$

	μ_{\max} , ч ⁻¹	t_D , ч
<i>Escherichia coli</i> , 35°C	> 2	< 0,35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 35°C	0,6	1,2
<i>Aspergillus niger</i> , 30°C	0,2	3,5
<i>Penicillium chrysogenum</i> , 25°C	0,12	5,7

v	= скорость деления, ч ⁻¹
μ	= скорость роста, ч ⁻¹
μ_{\max}	= максимальная скорость роста, ч ⁻¹
N	= число клеток, б/р
X	= биомасса, г/л
S	= концентрация лимитирующего субстрата, моль/л
K_s	= константа насыщения (константа Моно), моль/л
t	= время, ч

Образование продукта



Продуктивность

$$P = \frac{\text{Концентрация продукта}}{\text{Объем} \cdot \text{Время ферментации}}, \text{ ед./}(л \cdot \text{час})$$

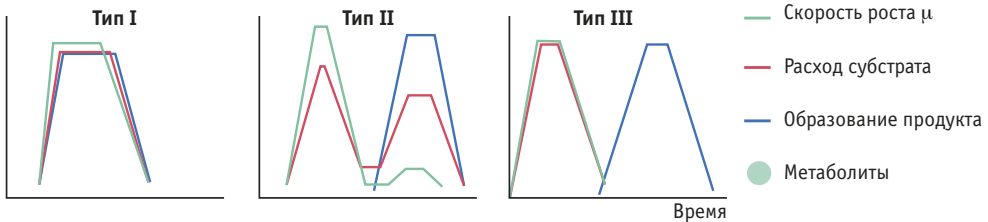
Экономические коэффициенты

$$Y_S = \frac{\text{Образование биомассы}}{\text{Расход субстрата}}, \text{ б/р}$$

$$Y_{O_2} = \frac{\text{Образование биомассы}}{\text{Потребление кислорода}}, \text{ б/р}$$

$$Y_{kj} = \frac{\text{Образование биомассы}}{\text{Выделение тепла}}, \text{ кг/кДж}$$

Типы ферментации



Тип I

Субстрат → Продукт

или

Субстрат → Продукт



Примеры: пекарские дрожжи, этанол, глюконовая кислота

Тип II

A → B → ● → Продукты первичного обмена

Субстрат → D → E → Продукт

Примеры: лимонная кислота, аминокислоты

Тип III

Субстрат → Рост клеток до конца лag-фазы

↓
Продукт вторичного метаболизма

Примеры: антибиотики, витамины, ферменты

Периодическая ферментация с добавлением субстрата и непрерывная ферментация

ВВЕДЕНИЕ. Периодическое добавление субстрата в биореактор позволяет увеличить продолжительность экспоненциальной фазы, во время которой синтезируются большинство белковых продуктов, поэтому в современной промышленности этот тип ферментации находит все большее применение. Непрерывная ферментация имеет важное значение для изучения закономерностей клеточного роста и метаболизма, однако в промышленных целях применяется очень редко.

ПЕРИОДИЧЕСКАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ С ДОБАВЛЕНИЕМ СУБСТРАТА (FED BATCH). Этот тип ферментации имеет два важных преимущества. Многие ценные продукты (антибиотики, внеклеточные ферменты, полисахариды и др.), получаемые при промышленном культивировании микроорганизмов, являются вторичными метаболитами, т. е. синтезируются по окончании экспоненциальной фазы роста клеток. Для того чтобы восполнять истощившуюся к этому времени питательную среду, в нее необходимо добавлять свежие питательные вещества, а также вещества-предшественники продукта. Периодическое, а не разовое введение глюкозы предотвращает замедление роста в результате так называемого ингибирования избытком субстрата. Процесс биосинтеза антибиотиков часто зависит от скорости образования некоторых катаболитов, поэтому для высокой эффективности синтеза необходимо в определенной мере ограничивать доступность тех или иных источников углерода, азота и фосфора. Такая регуляция становится возможной при осуществлении периодической ферментации с добавлением субстрата. При культивировании пекарских дрожжей в питательной среде с высоким содержанием сахара наблюдается высокая удельная скорость роста, однако из-за интенсивного образования этанола рост клеток при аэробной ферментации замедляется (так называемый эффект Крэбтри). Если целью периодической ферментации является получение биомассы дрожжей, необходимо избегать аэробных условий и постепенно добавлять глюкозу.

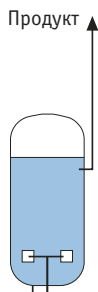
НЕПРЕРЫВНАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ. При непрерывной ферментации в культуру постоянно подают свежие питательные вещества и одновременно из нее отводится такой же объем клеточной суспензии. Непрерывную ферментацию можно проводить в реакторе с постоянной скоростью подачи питательных веществ (хемостате), в реакторе, в котором поддерживается постоянное количество клеток (турбидостате) или в реакторе идеального вытеснения (*plug-flow*), в котором суспензия клеток направленно поступает в реактор, а на выходе удерживается и вновь подается на вход. Использование реакторов идеального вытеснения особенно важно при подборе оптимальных условий ферментации. В разных участках реактора

наблюдаются различные условия: динамика изменений состава питательной среды, концентрации биомассы и продукта аналогична тому, что происходит при периодической ферментации в различные промежутки времени. В стационарном состоянии рост биомассы поддерживается на постоянном уровне благодаря удалению клеточной суспензии из реактора. Концентрация субстрата S и скорость образования продукта Q_x остаются постоянными. В этих условиях, если скорость образования продукта не зависит от скорости роста клеток, можно считать, что скорость образования продукта Q_x пропорциональна скорости прохождения клеток через реактор. Если целевой продукт является продуктом вторичного обмена, т. е. процессы роста биомассы и синтеза продукта являются сопряженными, математическая модель процесса непрерывной ферментации значительно усложняется. Непрерывная ферментация имеет очень важное значение для подбора и усовершенствования условий промышленной ферментации, а также для изучения влияния пониженного содержания определенного компонента среды на клеточный рост. В промышленности непрерывная ферментация не находит широкого применения, однако эти процессы используются при аэробной или анаэробной очистке сточных вод, а также в пивоварении и производстве человеческого инсулина с помощью рекомбинантных штаммов дрожжей. По сравнению с периодической ферментацией непрерывная ферментация имеет ряд недостатков: а) экономические преимущества непрерывного процесса проявляются лишь через 500–1000 часов ферментации, однако затраты на поддержание стерильности реактора в течение столь продолжительного времени могут оказаться весьма значительными; б) контроль и поддержание однородного состава питательной среды в течение длительного периода также требуют дополнительных мер; в) далеко не все рекомбинантные штаммы, используемые в промышленности, сохраняют свои генетически запрограммированные свойства в течение продолжительного времени.

Непрерывная ферментация

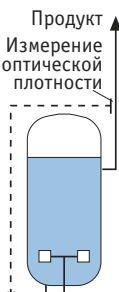
Типы реакторов

Хемостат



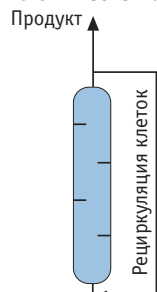
Продукт
Питательная среда (постоянная скорость поступления)

Турбидостат



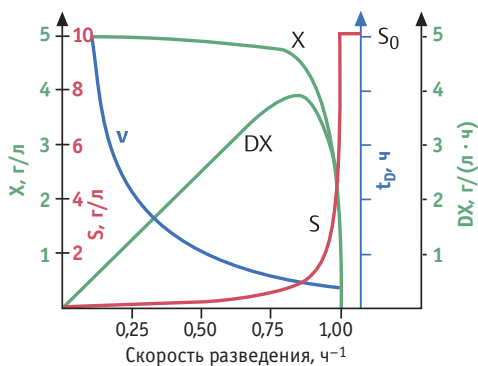
Продукт
Измерение оптической плотности
Питательная среда (постоянная клеточная масса)

Реактор идеального вытеснения



Продукт
Рециркуляция клеток
Питательная среда (постоянная скорость поступления)

Скорость разведения и выход продукта



S = концентрация субстрата, г/л
 X = биомасса, г/л
 t_D = время удвоения, ч
 DX = скорость образования клеток, г/(л · ч)

Уравнения, описывающие превращения биомассы и субстрата

Биомасса

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X \quad (1)$$

Субстрат

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_S} \quad (2)$$

В стационарной фазе:

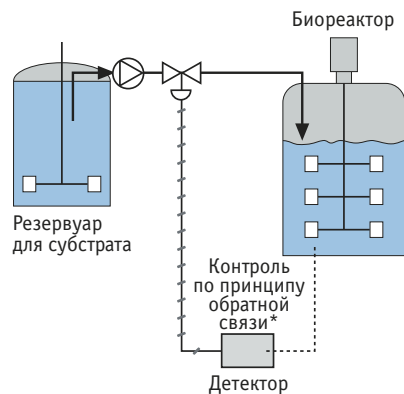
$$\frac{dX}{dt} = \frac{dS}{dt} = 0 \quad (3) \quad \text{и} \quad \mu = D$$

следовательно

$$X = Y_S (S_0 - S) \quad D = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad S = \frac{D \cdot K_S}{\mu_{\max} - D}$$

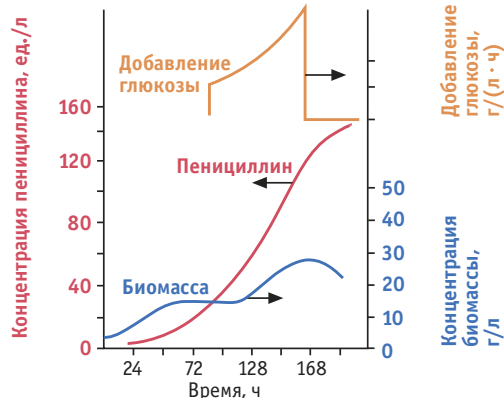
Y_S = экономический коэффициент, б/р
 K_S = константа Моно, г/л
 S_0 = концентрация субстрата на входе, г/л
 S = концентрация субстрата в ферментере, г/л
 D = скорость разведения, ч⁻¹
 X = биомасса, г/л
 μ = скорость роста клеток, ч⁻¹
 μ_{\max} = максимальная скорость роста клеток, ч⁻¹

Периодическая ферментация



* например, по массе

Образование пенициллина при периодическом добавлении глюкозы



Технология ферментации

ВВЕДЕНИЕ. Правильный расчет конструкции биореактора так же важен для осуществления экономически выгодного процесса ферментации, как и сведения о биологических характеристиках используемых микроорганизмов, полученные при биологических и биохимических исследованиях. Основные цели усовершенствования биореакторов заключаются в повышении безопасности проведения ферментации и минимизации промышленных затрат. При оптимизации конструкции биореактора рассматриваются следующие наиболее важные аспекты: 1) перемешивание среды роста микроорганизмов; 2) соблюдение температурного режима и 3) снабжение клеток кислородом в случае аэробной ферментации.

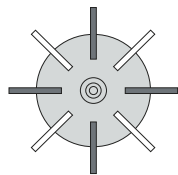
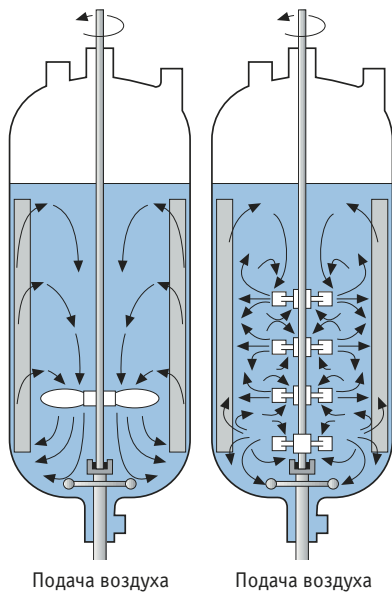
ПЕРЕМЕШИВАНИЕ в биореакторе осуществляется с помощью механического устройства или путем пропускания воздуха или другого газа. При перемешивании возникают турбулентные потоки, которые можно математически описать, используя число Рейнольдса (Re). Значение числа Рейнольдса обратно пропорционально вязкости среды — параметра, который в случае образующих мицелий организмов зависит от стадии роста микроорганизма и от концентрации продукта в среде. Наиболее наглядна зависимость скорости турбулентных потоков от количества продукта в среде в случае получения ксантановой смолы. Биореактор идеального перемешивания — это математическая модель, которую используют для изучения закономерностей роста микроорганизмов в биореакторе. В этом идеализированном случае считается, что концентрация любого компонента среды одинакова во всем объеме реактора, т. е. среда абсолютно гомогенна. На практике такая ситуация недостижима, так как любой биологический материал не идеальная жидкость: так, клетки мицелия весьма чувствительны к механическому воздействию, поэтому необходимо подобрать условия, обеспечивающие наиболее эффективное перемешивание и в то же время сохраняющие жизнеспособность биологического материала. На эффективность перемешивания влияет множество факторов: форма реактора, конструкция мешалок, их число и скорость вращения для реакторов с механическим перемешиванием или способ подачи газа (барботажная колонна или инжекторная подача) и конструкция насосов для аэроперемешивания. Число Ne — коэффициент мощности — отражает потребление энергии в процессе перемешивания содержимого реактора. В случае, когда через среду не пропускают газ, значение Ne связано с числом Рейнольдса. Для перемешивания в промышленных биореакторах разработано несколько конструкций, позволяющих эффективно проводить аэрацию и перемешивание. К таким устройствам относятся, например, крыльчатые диски и турбинные мешалки.

Эффективность перемешивания описывается объемным коэффициентом массопередачи $k_L a$.

ПОДДЕРЖАНИЕ ПОСТОЯННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ — необходимое условие для оптимального течения процесса ферментации. При росте микроорганизмов высвобождается большое количество энергии в виде тепла, перемешивающие устройства также выделяют тепло. Кроме того, определенный вклад вносят процессы общей теплопередачи и теплообмена на границах фаз. Обычно системы охлаждения с помощью змеевиков или охлаждающих рубашек достаточно для поддержания температуры ферментации на определенном уровне. Однако в некоторых случаях, например при использовании в качестве источников углерода алканов или метанола, требуются дополнительные устройства для охлаждения реактора.

АЭРАЦИЯ. Рост аэробных организмов замедляется, если концентрация кислорода в среде ниже некоторого критического значения. При подборе оптимальных условий аэрации учитывают биологические и технические особенности ферментации. Во-первых, оптимальная скорость переноса кислорода в реакторе зависит от максимальной скорости потребления кислорода микроорганизмами. Во-вторых, не следует забывать о том, что кислород в условиях ферментера находится в трехфазной системе (газ—питательная среда—клетка), и транспорт в такой сложной системе также должен быть оптимизирован. Общее сопротивление обмену кислородом складывается из отдельных сопротивлений в последовательных процессах переноса кислорода от газового пузырька до клетки: 1) диффузия газа к границе раздела фаз газ—жидкость; 2) перенос через границу раздела фаз газ—жидкость; 3) транспорт через жидкость к микроорганизму; 4) транспорт внутри клетки. В случае одноклеточных микроорганизмов на скорость переноса кислорода значительно влияет скорость диффузии кислорода к скоплениям клеток или мицелию. На процесс транспорта кислорода в жидкости влияет множество факторов: 1) технологические (размер реактора, заполненность реактора, эффективность перемешивания, интенсивность аэрации); 2) физико-химические (плотность и вязкость среды, температура, поверхностные свойства (необходимо добавление пеногасителей!)); 3) биологические характеристики микроорганизма (форма клеток). Важный показатель массообмена кислорода $k_L a$ можно измерить экспериментально.

Перемешивание в реакторе



Крыльчатые диски



Турбинные мешалки



Мешалка типа MIG



Мешалка типа Inter-MIG

Характеристики турбулентных потоков

Число Рейнольдса (Re)

$$Re = \frac{\text{Сила инерции}}{\text{Вязкость}} = \frac{d_R^2 n \rho}{\eta} \quad (\text{безразмерная величина})$$

Потребление энергии

Показатель мощности (Ne)

$$Ne = \frac{\text{Сила тяги}}{\text{Сила инерции}} = \frac{P_o}{d_R^5 n^3 \rho} \quad (\text{безразмерная величина})$$

d_R = Диаметр мешалки, м

n = Скорость вращения мешалки, c^{-1}

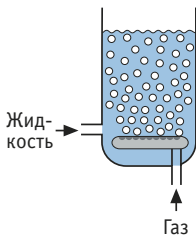
η = Динамическая вязкость раствора, $Па \cdot c$

P_o = Мощность мешалки, Вт

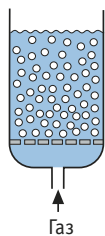
ρ = Плотность, $кг/м^3$

Системы аэрации реакторов

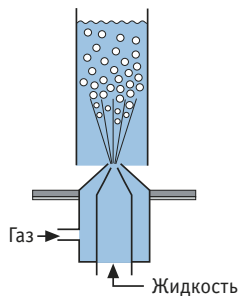
Перфорированное кольцо



Перфорированная пластина



Инжектор



Мешалка с устройством для аэрации



Потребность в кислороде

$$Q_{O_2} = X q_{O_2} = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}), \text{ моль}/(\text{л} \cdot \text{ч})$$

$q_{O_2}^{\max}$ = Максимальная скорость поглощения кислорода, $\text{моль}/\text{г} \cdot \text{ч}$

q_{O_2} = Скорость поглощения кислорода, $\text{моль}/\text{г} \cdot \text{ч}$

$k_L a$ = Объемный коэффициент массопередачи ($k_L a$), ч^{-1}

X = Концентрация биомассы, $\text{г}/\text{л}$

Скорость поглощения кислорода

$$q_{O_2} = q_{O_2}^{\max} \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}}, \text{ моль}/(\text{л} \cdot \text{ч})$$

C_{O_2} = Концентрация растворенного кислорода, $\text{моль}/\text{л}$

$C_{O_2}^*$ = Насыщающая концентрация кислорода, $\text{моль}/\text{л}$

K_{O_2} = Константа Михаэлиса для O_2 , $\text{моль}/\text{л}$

Кислородный обмен: коэффициент массопередачи $k_L a$

$$k_L a = \left(\frac{P}{V_R}\right)^\alpha (u_G^0)^\beta, \text{ ч}^{-1}$$

k, α, β = Константы (безразмерная величина)

P = Мощность мешалки, Вт

V_R = Объем реактора, м^3

u_G^0 = Скорость подачи газа, $\text{м}/\text{с}$

Объемная скорость подачи воздуха

$$V = \frac{\text{Объем воздуха}}{\text{Емкость реактора} \cdot \text{мин}}, \text{ мин}^{-1}$$

Показатель аэрации (N_B)

$$N_B = \frac{V_G}{n d_R^3} \quad (\text{безразмерная величина})$$

V_G = Скорость потока газа, $\text{м}^3/\text{с}$

n = Скорость вращения мешалки, с^{-1}

d_R = Диаметр мешалки, м

Промышленные процессы ферментации

ВВЕДЕНИЕ. Переход от процесса, разработанного в лаборатории, к промышленному производству не сводится к простому увеличению масштаба. В зависимости от технологического процесса используются различные конструкции биореакторов, среди которых наибольшее распространение получили реакторы с перемешиванием. Обычно процесс перехода к большим объемам производства осуществляется поэтапно (30 л → 300 л → 3000 л → промышленные масштабы).

МАСШТАБИРОВАНИЕ. Уже на уровне экспериментальных цехов биореакторы снабжены мешалками, турбинами, насосами и специальными устройствами для аэрации. Все эти инженерные приспособления необходимы для создания оптимальных условий культивирования клеток. При переходе к промышленным масштабам производства необходимо учитывать, что в больших реакторах время перемешивания должно быть значительно увеличено. Для того чтобы в реакторе объемом более 150 м³ достичь обычной для небольших объемов скорости вращения мешалки, потребуются огромные энергозатраты. Из этих же соображений крайне редко в промышленности используют рекомбинантные организмы, содержащие плазмиды с промотором фага λ: при повышении температуры, что необходимо для индукции генов под λ-промотором, может нарушиться стабильное течение процесса в большом реакторе. При расчете параметров аэрации учитывают повышенную чувствительность клеток стрептомицетов, *Aspergillus* и *Penicillium* к механическому воздействию. Аналогичные аспекты принимают во внимание, когда рассматривают прохождение газа через среду, а также отведение образовавшегося тепла с помощью теплообменников.

ТИПЫ БИОРЕАКТОРОВ. Первыми в промышленности были применены поверхностные реакторы (для производства лимонной кислоты) и пленочные биореакторы (биофильтры для аэробной очистки сточных вод). Такие конструкции относительно просты в эксплуатации, однако удельный выход продукта невелик. В современной промышленности наибольшее распространение получили реакторы с перемешиванием, снабженные системой контроля температуры и интенсивности аэрации, вентилями для отбора проб и стерильными элементами конструкции (трубы и т. д.). В процессах с многоступенчатой ферментацией используются реакторы с лопастными мешалками, а в случае одноклеточных организмов эрлифтные реакторы или барботажные колонны. При производстве уксусной кислоты и аэробной очистке сточных вод применяют мешалки, засасывающие воздух при вращении. Реакторы для исследовательских целей, как правило, имеют объем не более

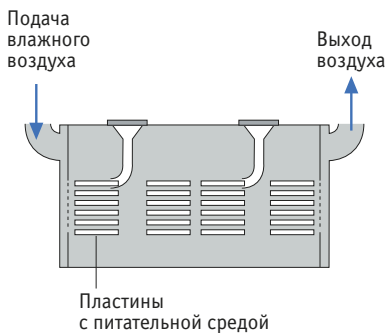
300 л, а в промышленности применяются реакторы с рабочим объемом до 500 м³. При ферментации в больших объемах значительными оказываются энергетические затраты на обеспечение быстрого перемешивания среды и отвода тепла для сохранения постоянной температуры. В масштабных производствах (например, производстве глутаминовой кислоты, белков одноклеточных организмов или при очистке стоков) используют эрлифтные реакторы объемом до 1500 м³, в которых аэрация осуществляется за счет внутренней или внешней рециркуляции газа.

КОНТРОЛЬНО-ИЗМЕРИТЕЛЬНАЯ АППАРАТУРА. Контроль условий культивирования необходим и в экспериментальных установках для подбора оптимальных параметров, и в ходе производственного процесса. Обычно измеряют следующие характеристики: вес клеточной массы, температуру культуральной жидкости, скорость вращения и потребляемую мощность перемешивающих устройств, содержание кислорода и pH среды. Часто в отработанных газах анализируют содержание CO₂ (методом ИК-спектроскопии) и O₂ (методом парамагнитного резонанса). По результатам всех анализов получают полную картину технологического процесса. Состав продукта и расход субстрата определяют путем периодического отбора проб без нарушения стерильности системы. Из-за больших затрат на проведение ферментации и высоких цен на сырье, ведется постоянный поиск возможностей для снижения затрат (технологический процесс получения продукта с рыночной ценой около 10 евро/кг в ферментере объемом 100 м³ с выходом продукта 100 г/л обходится в 100 000 евро).

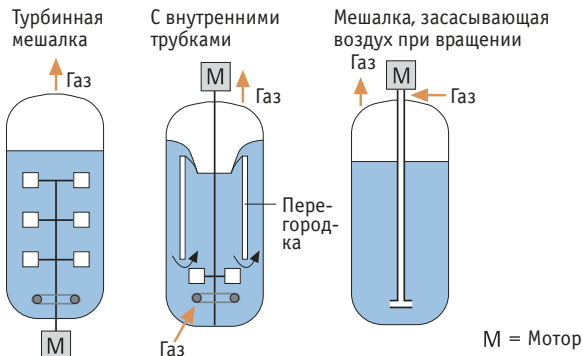
ПРОБЛЕМА ПЕНООБРАЗОВАНИЯ В ФЕРМЕНТЕРАХ. Интенсивная аэрация жидких сред, содержащих белки, часто сопровождается нежелательным пенообразованием. Для предотвращения этого обычно используют механические сбиватели пены, а при образовании слишком большого количества пены в среду добавляют химические пеногасители (например, эруковую кислоту или силиконы). Однако следует помнить, что присутствие химических реагентов может значительно усложнять процедуру очистки продукта, поэтому стараются использовать минимальные количества пеногасителей.

Типы биореакторов

Поверхностный биореактор

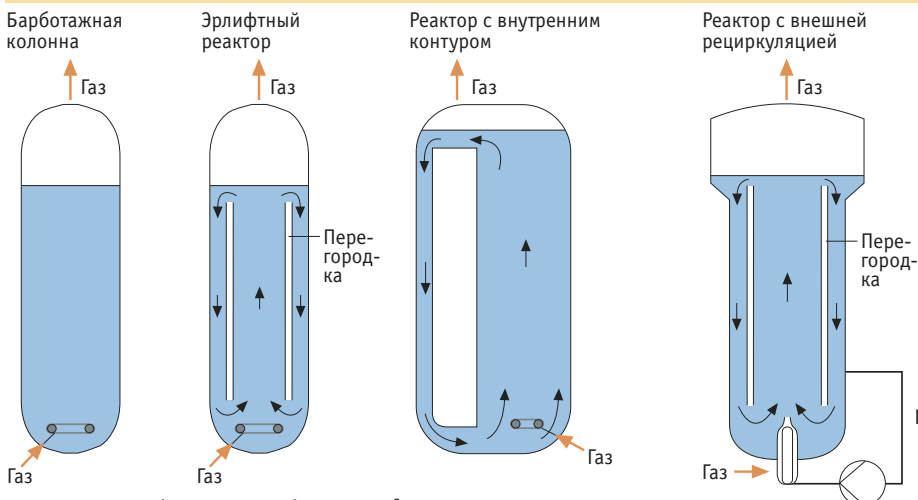


Реакторы с механическим перемешиванием



Обычно такие реакторы имеют объем до 150 м³

Барботажные колонны, эрлифтные реакторы и реакторы с внутренним контуром



Такие реакторы обычно имеют объем >150 м³

Скорость перемешивания в реакторах разного объема

Объем биореактора, л	3	9	100	300	1 000	3 000	24 000
Скорость вращения мешалки, об/мин	750	2 000	230	350	200	180	30
Время перемешивания, с	5	3	6,6	5	25	20	66

Параметры процесса ферментации

Физические параметры

Температура
 Давление
 Потребляемая мощность
 Вязкость
 Скорость прохождения газа
 Поступление среды
 Оптическая плотность среды
 Вес ферментера

Химические параметры

Величина pH
 Растворенный кислород
 Содержание O₂ и CO₂ в отработанных газах
 Редокс-потенциал
 Концентрация субстрата
 Концентрация продукта
 Концентрация ионов

Биологические параметры

Активность ферментов
 Содержание АТФ
 Содержание НАДФ
 Содержание белков

Красным обозначены параметры, значение которых можно регулировать

Культивирование животных клеток

ВВЕДЕНИЕ. В промышленности животные клетки культивируют с целью получения вакцин или белков для фармацевтического или диагностического применения, которые нельзя получить в клетках микроорганизмов. Невозможность получения этих белков в виде рекомбинантного продукта микробной ферментации может объясняться несколькими причинами: структура белка стабилизируется большим количеством дисульфидных связей, белок приобретает активность только после посттрансляционных модификаций, неправильное гликозилирование приводит к развитию иммунной реакции. В качестве примеров таких белков можно привести терапевтические антитела, фактор VIII, эритропоэтин и тканевой активатор плазминогена. Культивирование животных клеток с целью получения определенного продукта – чрезвычайно трудоемкая и дорогая процедура. Поэтому ведутся поиски альтернативных путей получения определенных белков с использованием трансгенных животных и растений. В настоящее время ведется активное изучение условий культивирования клеток человека с целью получения тканей для трансплантации и тестирования действия лекарств.

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. В последние десятилетия культивирование клеток человека активно применяется для обнаружения вирусов, а также для разработки противовирусных вакцин. Клетки определенной ткани человека, полученные от донора и размножившиеся в питательной среде, можно заморозить и хранить в морозильных установках при $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Так создаются целые банки клеток различных тканей, как здоровых, так и имеющих определенную патологию. После того как клетки отобраны из банка, они сохраняют жизнеспособность в жидкой среде на протяжении около 50 циклов деления. Затем такие «первичные» клетки необходимо поместить на твердую питательную среду. Таким образом, процесс культивирования клеток человека для получения определенного продукта имеет строгие ограничения. По самым последним данным, удалось совместно культивировать клетки различных типов, что в перспективе может привести к созданию искусственных тканей (например, кожи). Методы «тканевой инженерии» имеют большие перспективы для своего использования. Наибольший интерес вызывает культивирование стволовых клеток человека, способных при созревании превращаться в любые клетки организма.

ЛИНИИ КЛЕТОК. Для получения белков, имеющих терапевтическое значение, как правило, используют хорошо охарактеризованные линии клеток млекопитающих. Они обладают способностью к безграничному делению и проявляют следующие свойства: 1) короткое время генерации (20–30 ч); 2) относительно

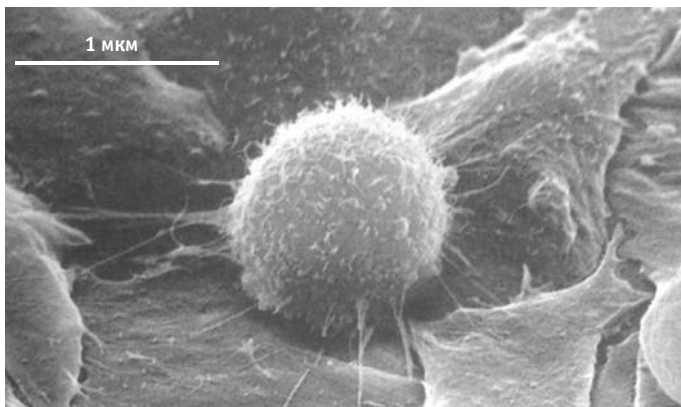
нестрогие требования к условиям культивирования; 3) при этом в отличие от «первичных» клеточных культур, которые растут в суспензии, и может быть достигнута высокая плотность культуры (это свойство позволяет культивировать клетки в биореакторах); 4) легко трансформируются. Для производства белков в промышленности используют клетки следующих типов: 1) гибридомные клетки применяют для получения моноклональных антител (в основном для диагностики); 2) фибробласты клеток яичника китайского хомячка (клетки CHO); 3) опухолевые клетки из почек сирийского хомячка (клетки ВНК).

ВЕКТОРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ. Клонирование генов в животных клетках проводят с использованием специально сконструированных векторов. ДНК этих векторов обладает способностью встраиваться в геном хозяйской клетки и использовать имеющиеся промоторы. Обычно используют *челночные* векторы, которые перед внесением в животную клетку можно оптимизировать, например, в клетках *E. coli*. В качестве селективного маркера, указывающего на наличие вектора в геноме животной клетки, в конструкцию вводят ген, продукт которого обезвреживает токсичные для обычных клеток вещества, например неомицин или соли кадмия. Векторы для промышленного культивирования клеток обычно несут ген дигидрофолатредуктазы: при встраивании вектора в геном клеток, не обладающих этим ферментом (например, штамм CHO-K1), они приобретают способность расти на среде с метотрексатом. Этот аналог фолиевой кислоты ингибирует синтез тимидина в *dhfr*-отрицательных клетках. Таким образом, аутокотрофные по тимидину *dhfr*-отрицательные клетки в результате трансфекции могут расти на минимальной среде в присутствии метотрексата, размножаться и продуцировать белок, ген которого клонирован в челночный вектор. Известны примеры промышленных векторов, продуцирующих тАП и фактор VIII в клетках CHO.

Часто используемые линии животных клеток

Обозначение клеточной линии	Источник	Область использования
NIH3T3	Фибробласты мыши	Изучение процесса онкогенеза
BHK	Почка сирийского хомячка	Рекомбинантные белки
CHO	Яичник китайского хомячка	тАП, фактор VIII, эритропоэтин и др.
SP 2/0	Миелома мыши	Моноклональные антитела
BS-C-1	Почка зеленой мартышки	Человеческие вакцины

Использование животных клеток для получения полезных продуктов

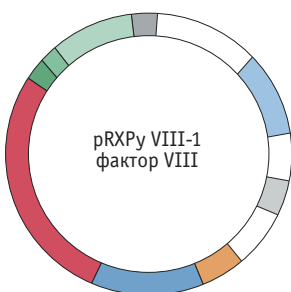


«Полезные» качества:

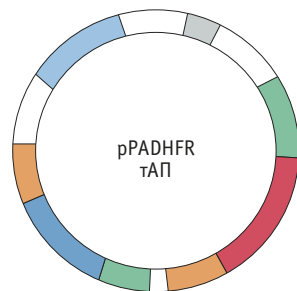
- бессмертность
- легкость проведения трансформации
- возможность роста в суспензии с высокой плотностью клеток
- высокая скорость деления клеток
- нестрогие требования к условиям среды

◀ клетка CHO

Примеры векторов для экспрессии в клетках CHO



- colE1-ori
- Ген устойчивости к тетрациклину
- Участок начала репликации и энхансер вируса полиомы
- Поздний промотор аденовируса
- Первый экзон аденовируса (поздние гены)
- Следующий за первым экзоном интрон с 5'- и 3'-сайтами сплайсинга
- кДНК фактора VIII
- кДНК ДГФР
- Ранний терминатор вируса SV40



- Ген устойчивости к ампициллину
- colE1-ori
- Ранний промотор вируса SV40
- кДНК тканевого активатора плазминогена (тАП)
- Терминатор HBsAg
- кДНК ДГФР

Селективные маркеры и маркеры амплификации вектора

Маркерные гены в векторе экспрессии	Компонент среды	Селекция/амплификация	Применение
Неомицин-фосфотрансфераза	Неомицин	Отбор клеток, устойчивых к неомицину	Нельзя использовать для промышленного получения белков
Металлотионин	Ионы кадмия	Отбор клеток, устойчивых к наличию ионов кадмия	Только научные исследования
Дигидрофолат-редуктаза (ДГФР)	Тимидин и метотрексат (ингибиторы ДНФР)	Отбор трансфицированных клеток; об амплификации судят по устойчивости к метотрексату	Используется в промышленности

Биореакторы для культивирования животных клеток

ВВЕДЕНИЕ. За последние десятилетия разработаны различные методы культивирования животных клеток. Одной из самых сложных задач была оптимизация питательной среды. Некоторые белки, имеющие важное значение для медицины, могут быть получены в активной форме только в животных клетках. К таким белкам относятся человеческие антитела, фактор VIII, тканевой активатор плазминогена и др. Для их производства используют биореакторы объемом до 10 000 л. Как и в случае микробной ферментации, при культивировании животных клеток высокие требования предъявляются к перемешиванию и аэрации клеточной суспензии. Обычно белки, полученные в животных клетках, очень тщательно очищают, избавляясь не только от примесей других белков, но и от следовых количеств ДНК или РНК (в особенности ретровирусной).

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. Наряду с интенсивным снабжением клеток кислородом и CO_2 для успешного культивирования животных клеток необходим правильно подобранный состав питательной среды. В качестве источника углерода обычно используют глюкозу. В питательной среде должны присутствовать также аминокислоты, витамины, белки, жирные кислоты, неорганические соли и другие вещества, необходимые для роста клеток. Ранее в среды добавляли сыворотку крови быка: в ней содержится большое количество белков, необходимых для роста культуры животных клеток, однако эта сыворотка очень дорогая, при этом существует высокий риск заражения культуры вирусами или бактериями. В среды, не содержащие сыворотки, вносят трансферрин, инсулин, сывороточный альбумин и липопротеины. Для поддержания постоянного уровня pH в среду культивирования добавляют бикарбонаты или проводят все операции в атмосфере CO_2 .

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ. В лабораторных условиях культивирование животных клеток проводят в роллерных бутылках или специальных флаконах. Если требуется большой объем (до 10 л), используют спиннерные емкости. В таких условиях удается достигнуть концентрации клеток 1–2 млн/мл.

КЛЕТОЧНЫЙ РЕАКТОР. При переходе к биореакторам необходимо помнить о том, что в ходе непрерывной и периодической ферментации могут образовываться токсичные вещества, ингибирующие синтез рекомбинантного продукта. В случае перфузионных культур среду роста регулярно обменивают на свежую. Из соображений безопасности (снижение риска распространения инфекции) в промышленности, как правило, используют периодическую ферментацию. Животные клетки в культуре очень чувствительны к любым изменениям среды и механическим воздействиям, поэтому возникает сложная инженерная зада-

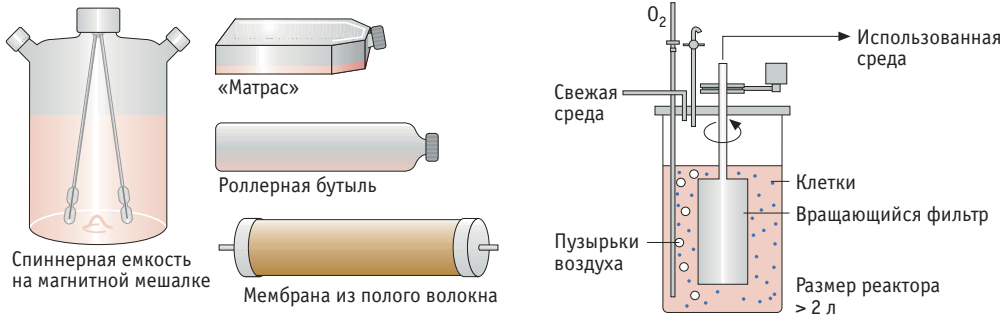
ча — создание системы, которая бы эффективно снабжала клетки кислородом, не разрушая их. Оптимальное значение коэффициента массопередачи кислорода $k_L a$ для животных клеток составляет 2,2 в час (для микроорганизмов эта величина на 1–2 порядка больше). Разработано несколько способов «непрямого» снабжения клеток газом, например с помощью полупроницаемых мембран из силикона. Таким образом, в реакторе объемом 1000 л с вращающейся мембраной при давлении до 6 бар интенсивность снабжения кислородом достигает $120 \text{ г O}_2/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$. Цены на питательные среды для животных клеток очень высокие, поэтому важно рационально использовать эти среды. При непрерывном культивировании перфузионным способом клетки удерживаются в среде посредством мембранного фильтра с микропорами. При достижении необходимой плотности клеток начинается переработка биопродукта в непрерывном режиме. Таким образом удается поддерживать систему в равновесном состоянии (т. е. осуществлять культивирование и производство продукта) на протяжении более 900 ч. Процесс образования продукта в клетках, иммобилизованных на микрочастицах, также может быть весьма продолжительным (до 30 сут.). В современной промышленности метод непрерывного культивирования используется исключительно для суспендированных клеток в масштабах до 10 000 л на средах, не содержащих сыворотки.

ОЧИСТКА ПРОДУКТА. В отличие от большинства процессов микробной ферментации для очистки продукта животных клеток нет необходимости в разрушении клеток, так как он секретируется в среду роста. В то же время для продукта животных клеток требуется очень тщательная очистка, которая, кроме идентификации продукта (пептидное картирование, определение аминокислотной последовательности, масс-спектрометрия MALDI-TOF, двумерный электрофорез белков) включает контроль отсутствия онкогенной и способной к трансформации ДНК животных клеток. В фармацевтическом препарате должна полностью отсутствовать ретровирусная РНК, и может содержаться не более 100 пикограмм (10^{-10} г) ДНК на дозу.

Состав питательных сред

Среды, содержащие сыворотку	Среды, не содержащие сыворотку
D-Глюкоза, L-глутамин	D-Глюкоза, пируват Na, L-глутамин
Аминокислоты	Аминокислоты
Сыворотка быка	Бычий сывороточный альбумин, инсулин, трансферрин, этаноламин, селенит (ITES-среда)
Минеральные вещества	Минеральные вещества
O ₂ и CO ₂	O ₂ и CO ₂

Культивирование животных клеток в лабораторных и промышленных условиях



Варианты культивирования

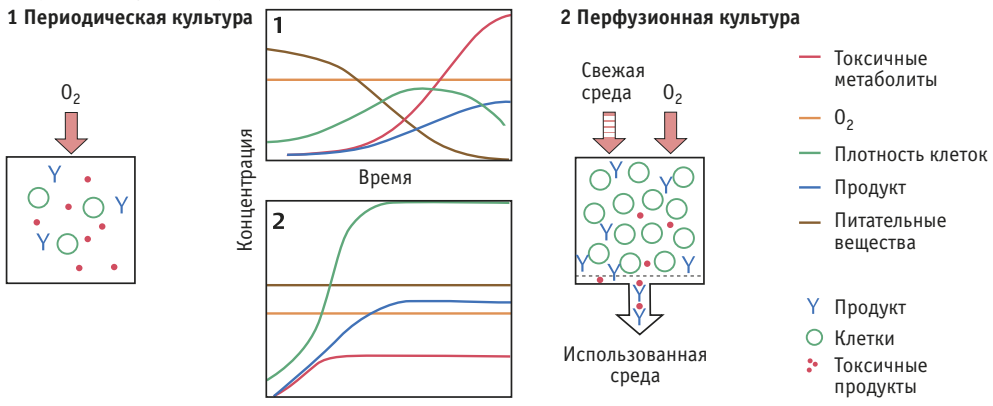
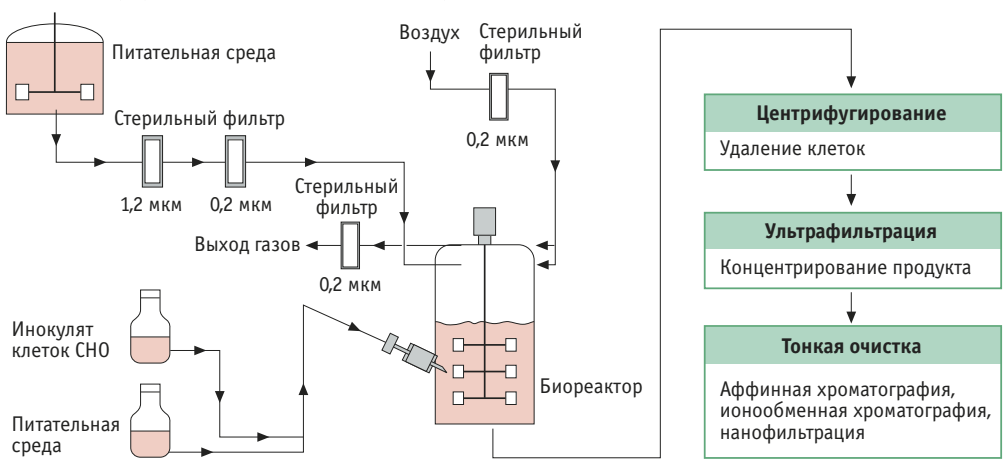


Схема непрерывного технологического процесса с клетками CHO



Биореакторы с иммобилизованными ферментами и клетками

ВВЕДЕНИЕ. Из экономических соображений промышленное производство, как правило, основано на использовании иммобилизованных катализаторов. Выделенные ферменты включают в небольшие частицы или закрепляют на носителе. Если процедура очистки внутриклеточного фермента слишком трудоемкая, в реакторе иммобилизуют непосредственно клетки микроорганизма – продуцента фермента. Такие клетки обычно осуществляют несколько последовательных превращений.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ. Один из способов иммобилизации связан с применением ионообменных смол. В этом случае клетки или ферменты связываются с носителем за счет адсорбции. Для иммобилизации клеток за счет ковалентных взаимодействий применяют три способа: 1) связывание с глутаровым диальдегидом, приводящее к образованию оснований Шиффа, и стабилизация путем восстановления боргидридом натрия; 2) иммобилизация на диизоцианатах; 3) фиксация на полимерных эпоксидных смолах (оксиранах). В качестве носителя используются разнообразные органические или неорганические материалы. Для иммобилизации ферментов также применяют глутаровый альдегид или диизоцианаты. Клетки или ферменты включают в полимерные гели, полученных при радикальных или фотохимических реакциях. Так, ферменты могут включаться в полиакриламидный гель в присутствии N, N'-метиленабисакрил-амида после добавления персульфата калия. В качестве примера полимеризации в результате фотохимической реакции можно привести образование полиуретана. При микрокапсулировании ферменты или клетки включают в микрокапсулы в реакциях полимеризации на границе раздела водной и органической фаз. Часто для иммобилизации используют ионотропные гели, например альгинаты, которые полимеризуются в средах, содержащих ионы кальция. В настоящее время ведутся активные исследования возможностей включения биокатализаторов в состав искусственных волокон, например из производных целлюлозы.

СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ. Иммобилизованные биокатализаторы отличаются по своим свойствам от свободных ферментов или клеток: интенсивность процесса в случае иммобилизованных биокатализаторов определяется не только свойствами самого катализатора, но также процессами транспорта субстрата и продукта в направлении катализатора и от него. С целью оптимизации свойств иммобилизованных биокатализаторов предложены методы математического моделирования с учетом, кроме свойств фермента, других факторов, например размер частиц, на которых иммобилизован биокатализатор, и скорость транспорта веществ. Од-

но из важных преимуществ использования иммобилизованных биокатализаторов – их стабильность. В промышленном процессе срок службы иммобилизованных клеток или ферментов обычно составляет несколько месяцев (например, клетки, синтезирующие аспарагиновую кислоту, ферменты глюкозиомеразы или пенициллинацилазы).

ТИПЫ БИОРЕАКТОРОВ И ТЕХНОЛОГИЯ ПРОЦЕССА. Основные типы ферментативных и клеточных биореакторов – трубчатые реакторы (с неподвижным слоем катализатора, с псевдоожиженным слоем катализатора, с неподвижным слоем катализатора и со струйным течением жидкости) и реакторы с перемешиванием (непрерывного или периодического действия). Наряду с усовершенствованием биокатализаторов (повышение их стабильности) и оптимизацией биореактора или ферментативного реактора (с учетом различных скоростей диффузии низко- и высокомолекулярных веществ) ведутся работы по выбору условий проведения реакции для максимального выхода продукта. К этим условиям относятся: подготовка исходных веществ, предотвращение побочных реакций и обработка продукта в зависимости от его применения. На производстве предпочтение отдано относительно простым операциям, которые можно контролировать и в случае необходимости регулировать. Для получения больших объемов продуктов, например фруктозных сиропов или β-аминопенициллановой кислоты, обычно используют непрерывный технологический процесс, в ходе которого параллельно протекают несколько ферментативных реакций. Производство организовано таким образом, что модули, оснащенные биокатализаторами, могут подключаться поочередно, так что, когда ферментативная активность в одном модуле истощается, без остановки процесса включается другой модуль. Для производства небольшого количества продукта достаточно одного реактора.

Носители для иммобилизации

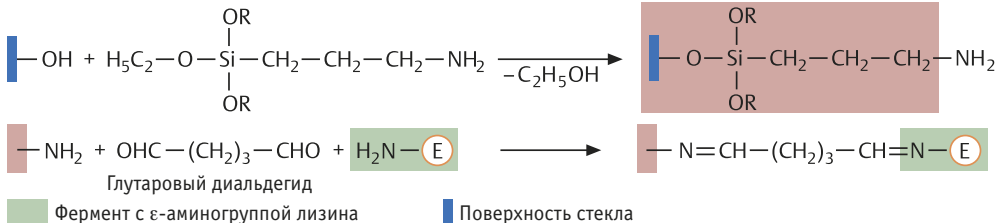
Неорганические носители

Al ₂ O ₃	Гели фосфата кальция
Бентонит	Пористые керамические материалы
Пористое стекло	

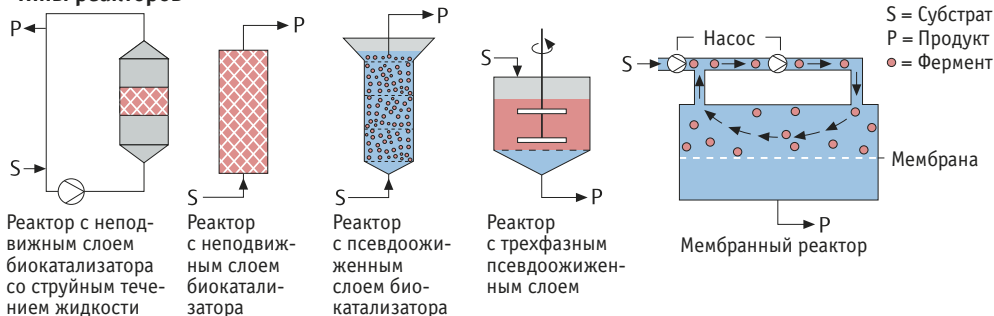
Природные и синтетические полимеры

Активированный уголь	Оксираны	Коллаген
Полиакриламид	Агароза	Полиамид
Карбоксиметилцеллюлоза	Альгинаты	Целлюлоза
Полиуретан	Декстран	

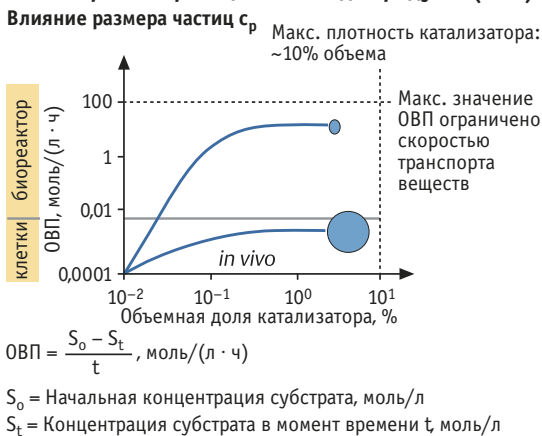
Иммобилизация на поверхности стекла



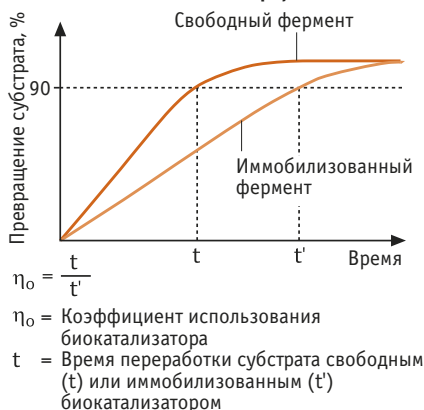
Типы реакторов



Связь времени реакции и выхода продукта (ОВП)



Влияние иммобилизации фермента



Влияние транспорта веществ

Внутренний транспорт: **модуль Тиле φ**

$$\varphi = \frac{\text{Количество реагирующих веществ}}{\text{Количество диффундирующих веществ}}$$

$$\varphi = \frac{d_p^2}{4} \cdot \frac{\delta_{\max}}{K_m \cdot D^e}$$

Внешний транспорт веществ: **число Шервуда Sh**

$$\text{Sh} = \frac{\text{Массообмен}}{\text{Диффузия}} \quad \text{Sh} = \frac{k_f \cdot d_p}{D_0} \quad \text{б/р}$$

D^e = Эффективный коэффициент диффузии, м²/с
 k_f = Коэффициент транспорта веществ, м/с
 d_p = Размер частиц, м
 D_0 = Коэффициент молекулярной диффузии, м²/с
 δ_{\max} = Максимальная концентрация катализатора
 K_m = Константа Михаэлиса

Очистка биотехнологических продуктов

ВВЕДЕНИЕ. Образовавшийся в процессе ферментации продукт может накапливаться внутри клетки (если продукт является внутриклеточным ферментом или белком в составе телец включения) или выходить в культуральную среду. В традиционно применяемых для ферментации штаммах концентрация продукта обычно небольшая и составляет менее 10%, а часто даже менее 1% клеточного содержимого. Методы генетической инженерии позволяют значительно повышать выход продукта: в некоторых случаях этот показатель достигает 50%. После завершения ферментации следуют стадии концентрирования и очистки полученного продукта. Выбор способа очистки зависит от целей использования продукта. Так, вещества, которые в дальнейшем будут применяться в фармакологии и при проведении клинических анализов, подвергаются очень тщательной очистке, в то время как препараты ферментов для технического использования часто содержат примеси. Стоимость очистки продукта может составлять более 50% всех затрат на его производство, поэтому разработка усовершенствованных методов, позволяющих снизить расходы на очистку без потерь качества продукта, имеет важное экономическое значение. Особое внимание уделяется переработке отходов, образовавшихся при выделении и очистке продукта (например, клеточной массы).

КЛЕТОЧНАЯ МАССА. При производстве пекарских дрожжей биотехнологическим продуктом является клеточная масса. Осажденные центрифугированием клетки промывают и пропускают через ротационный вакуумный фильтр барабанного типа или пластинчатый фильтр. Полученный продукт в полусухом виде высушивают распылением. В последнем случае срок хранения, например, дрожжей значительно увеличивается. Для сбора клеток также используют фильтрацию клеточной суспензии.

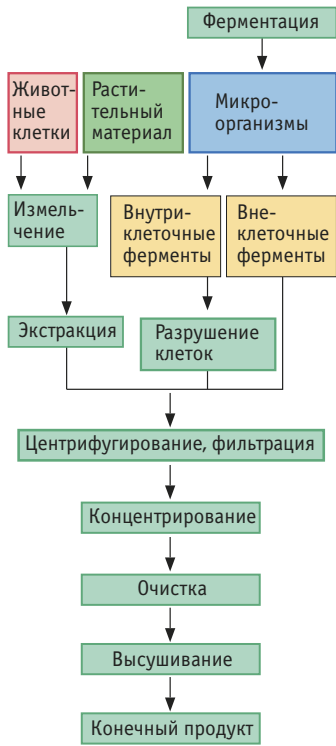
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ. Для выделения внутриклеточных продуктов клетки должны быть разрушены. Разработано множество способов разрушения клеток, однако в промышленности наиболее распространены физические методы с использованием шаровых мельниц или гомогенизаторов высокого давления. Для разрушения клеточной стенки в мягких условиях используют ферменты. В лабораторных условиях клетки, как правило, разрушают ультразвуком или ферментативными методами (например, клетки *E. coli* обычно обрабатывают лизоцимом в присутствии неионных ПАВ). В зависимости от наличия *сигнальной последовательности* белки находятся в цитоплазме или в периплазматическом пространстве. Рекombинантный белок может оказаться в составе телец включения за счет образования аномальных дисульфидных связей. После мягкого раз-

рушения клеток тельца включения отделяют центрифугированием. В результате обработки тельца включения тиолами и мочевиной белок переводится в растворимое состояние, причем современные методики позволяют сделать этот процесс обратимым. При удалении мочевины диализом возможна ренатурация белка с образованием правильной системы дисульфидных связей. Дальнейшие этапы очистки внутриклеточных ферментов и ренатурированных из телец включения белков аналогичны соответствующим этапам очистки внеклеточных продуктов.

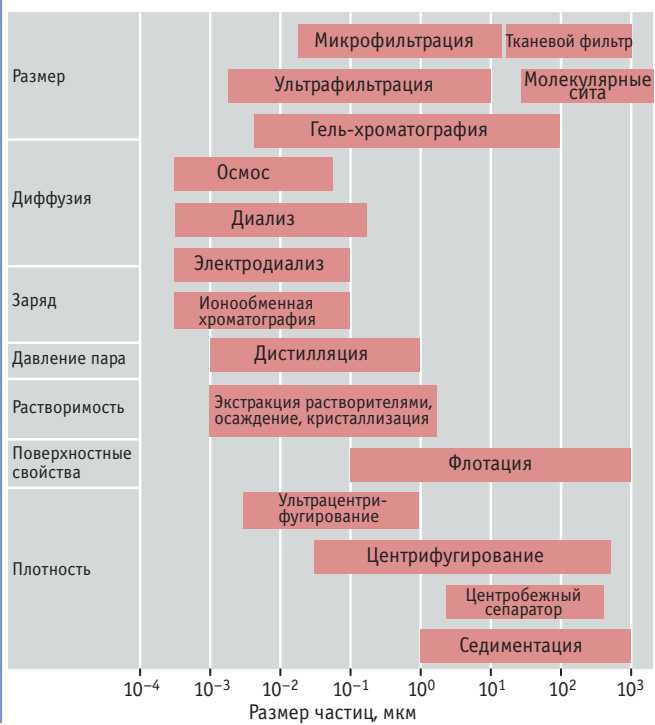
ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ. После отделения клеточной массы из культуральной жидкости осаждают низкомолекулярные продукты, например аминокислоты или лимонную кислоту. Процедура выделения и очистки антибиотиков включает несколько этапов экстракции органическими растворителями (например, *n*-бутилацетатом). Белки, в том числе и ферменты, часто выделяют фильтрованием через мембраны. Для осаждения белка после фильтрования в раствор добавляют соли – сульфат аммония или натрия до высоких концентраций (высаливание). Для каждого белка характерна специфическая концентрация солей, достаточная для осаждения. Большинство белков осаждаются при содержании соли 10–50%. Другой способ выделения белка заключается в экстракции: для этого в раствор добавляют небольшое количество (2–10%) охлажденного органического растворителя, например 2-пропанола. Для технических целей ферменты используются в виде фильтрата в жидком или высушенном виде.

КОМБИНИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ. Одновременное выделение нескольких продуктов в одном резервуаре позволило бы значительно сократить время процесса и общую площадь производства. Однако на практике такие возможности удается реализовать очень редко. Интересным примером является создание промышленной установки, в которой объединены процедуры отделения клеток и очистки продукта. В этой установке клеточный бульон пропускают через несколько неподвижных слоев ионообменной смолы. Экстракция в двухфазной системе, состоящей из смешивающихся водных растворов солей или полимеров, – еще один перспективный метод выделения биотехнологических продуктов.

Схема очистки биотехнологического продукта

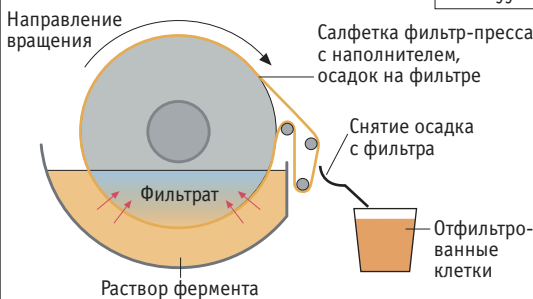


Принципы разделения

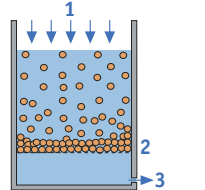


Фильтрация

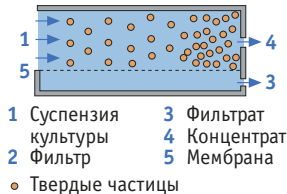
Ротационный вакуумный фильтр



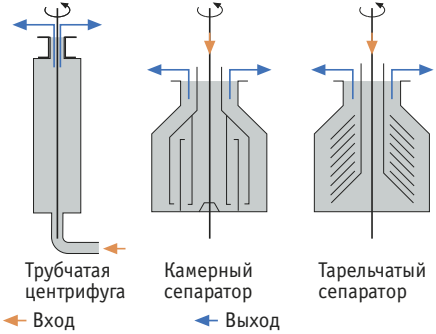
Фильтрация в статическом режиме



Фильтрация в проточном режиме

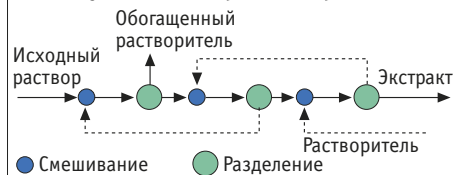


Центрифугирование



Экстракция растворителями

Многоступенчатая экстракция в противотоке



Использование мембран для выделения и очистки биотехнологических продуктов

	Обратный осмос	Ультрафльтрация
Принцип	Транспорт за счет диффузии	Разделение молекул по размеру
Удерживаемые частицы	$M_R < 500-1000$	$M_R > 1000$
Осмотическое давление	0,8–10 мПа	Очень низкое
Рабочее давление	1–15 мПа	< 1 мПа

Очистка биотехнологических продуктов: хроматографические методы

ВВЕДЕНИЕ. Хроматографические методы занимают важное место среди методов очистки биотехнологических продуктов. Для расчета оптимальных условий хроматографического процесса в колонке пользуются уравнением Ван-Деемтера. В зависимости от принципа разделения выделяют 1) гель-хроматографию (по молекулярной массе), 2) адсорбционную хроматографию (гидрофильные/гидрофобные взаимодействия), 3) ионообменную хроматографию (по заряду), 4) изоэлектрофокусирование (по изоэлектрическим точкам) и 5) аффинную хроматографию (основана на специфическом взаимодействии с лигандами). Для выделения рекомбинантных белков чаще всего используют метод аффинной хроматографии, для которой разработано большое количество разнообразных приборов, носителей и реагентов. Например, система Äkta-System™ позволяет в течение нескольких часов подобрать оптимальные условия очистки белкового продукта. В лабораторных условиях хроматографическое разделение белков часто проводят, подавая элюент под высоким давлением (например, высокоэффективная жидкостная хроматография белков, или *англ.* fast protein liquid chromatography, FPLC). Для разделения белков в больших объемах также используют методы хроматографии, однако разделение под высоким давлением в промышленности осуществляется очень редко.

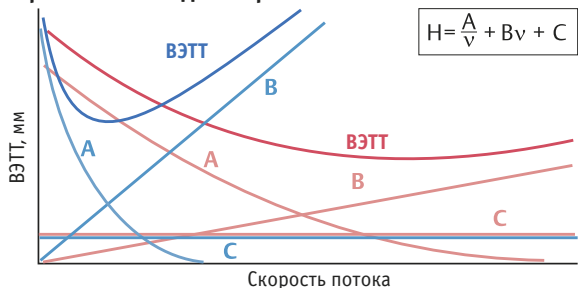
ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ. В качестве носителя наиболее часто используют декстрановые или агарозные гели. Изменяя состав геля (т. е. содержание в нем декстрана или агарозы), можно регулировать размер пор. После частичного алкилирования гидроксильных групп на таком носителе можно работать с органическими растворителями.

АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. Гидроксиапатит — самый широко используемый гидрофильный носитель для адсорбционной хроматографии. В качестве гидрофобных носителей применяют бутил- или фенилсефарозные гели. Разделение основано на гидрофобных или гидрофильных взаимодействиях между компонентами смеси и материалом носителя.

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. Ионообменную хроматографию обычно применяют для разделения смеси белков. Метод часто используется для очистки продуктов биотехнологической промышленности. Смесь пропускают через колонку с неподвижным слоем ионообменной смолы. Смолы представляют собой производные полисахаридов с сульфонильными (катионит) или аминогруппами (анионит). Разделение происходит в зависимости от заряда белка при определенных значениях pH.

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. Этот элегантный метод основан на взаимодействии белков со специфическими лигандами, иммобилизованными на носителе. Например, для выделения дегидрогеназ используют производное декстрана с необычной структурой. Определенные группы такого носителя взаимодействуют с дегидрогеназой непосредственно в ее участке связывания с NADH. Для элюирования связавшегося белка используют низкомолекулярные соединения, конкурирующие с носителем за участки связывания с белком. В промышленности очистку препаратов для фармацевтического применения проводят методом иммунной хроматографии. На носителе иммобилизуют моноклональные антитела, специфически взаимодействующие с белком. Элюирование связавшегося продукта происходит при повышении ионной силы раствора или закислении среды. В лабораторных условиях процедура очистки рекомбинантного белка часто облегчается путем его специфической модификации. Например, рекомбинантный белок часто экспрессируют слитым с другим белком, для которого процедура очистки хорошо разработана. Таким «партнером» для облегчения выделения может служить стрептавидин. Для выделения слитых со стрептавидином белков используют колонки, на которых иммобилизован биотин. Другой распространенный метод модификации белка с целью облегчения его очистки заключается в генетически запрограммированном надстраивании C- или N-конца последовательностью из нескольких (4–6) остатков гистидина (tag) с использованием методов генетической инженерии. Белок, содержащий такую последовательность, с высокой эффективностью связывается с носителем — никельсодержащим производным полисахарида. Часто при оптимизации выделения белка прибегают к таким модификациям, чтобы обработка выделенного продукта специфическими протеиназами вновь приводила к образованию исходного белка.

Уравнение Ван-Деемтера



H = Высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

v = Скорость потока

A = Вклад продольной диффузии

B = Вклад неоднородности потока подвижной фазы

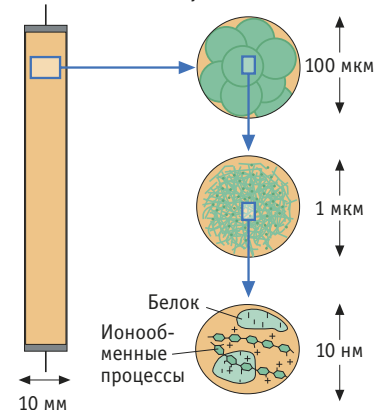
C = Вклад кинетики массопередачи

— Белки

— Низкомолекулярные соединения

Полимерный носитель

Пример катионообменной смолы на основе полисахарида

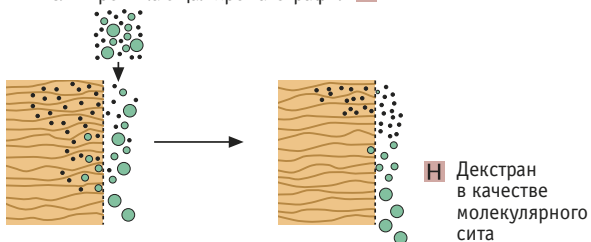


Способы применения полимерного носителя

Аффинные лиганды **A B**



Гель-проникающая хроматография **H**



Примеры лигандов

Гидрофобные взаимодействия

C бутил-, октил-, фенил-

Катионит

D карбоксиметил-

E сульфопропил-

Анионит

F диэтиламиноэтил-

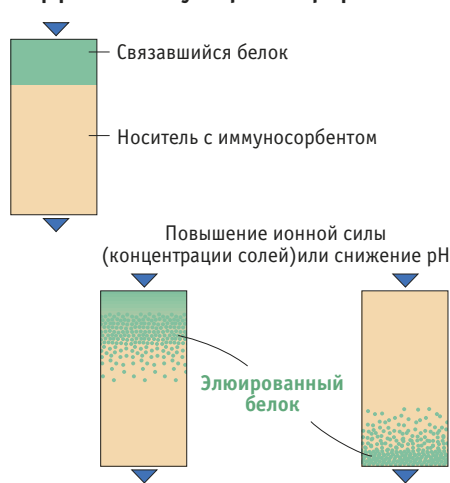
G триметиламинотил-

Аффинная хроматография

A специфические лиганды

B иммунные взаимодействия

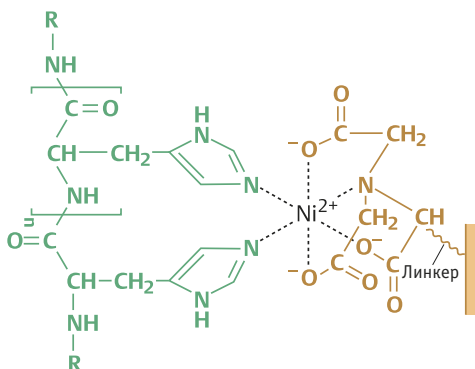
Аффинная иммунохроматография



Хроматография с использованием гистидинового тага (tag)

Модифицированный белок, несущий на конце 4–6 остатков гистидина

Нитрилтриуксусная кислота как лиганд



Экономические аспекты биотехнологического производства

ВВЕДЕНИЕ. При разработке и оптимизации биотехнологических процессов важную роль играют экономические факторы. Экономика диктует следующие важные цели: 1) разработать простые и технические надежные процессы; 2) минимизировать капитальные затраты, а также по возможности сократить персонал; 3) повысить эффективность производства: использовать дешевые энергоносители и сырье, повысить выход продукта, сократить время проведения технологического процесса; 4) разработать недорогие методы переработки отходов и очистки стоков.

УПРОЩЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ. В биотехнологической промышленности, где производство практически всегда состоит из множества отдельных стадий, и возможность объединить хотя бы две стадии получения или обработки продукта имеет важное экономическое значение. Так, в производстве антибиотиков широкое распространение получил декантатор фирмы Westphalia, позволивший одновременно осуществлять стадии отделения клеток и экстракции растворителем. Обеспечение личной безопасности персонала во время технологического процесса является важнейшим критерием. В биотехнологической промышленности кроме обычных правил техники безопасности, связанных с инженерным обслуживанием системы, особое значение имеют меры по предотвращению заражения персонала инфекционными заболеваниями при работе с патогенными штаммами. Полная стерильность процесса также имеет очень важное экономическое значение: попадание нежелательных микроорганизмов в ферментер в результате неудовлетворительной стерилизации может привести к потере большого объема продукта и к значительным финансовым потерям.

УМЕНЬШЕНИЕ КАПИТАЛЬНЫХ ЗАТРАТ И СОКРАЩЕНИЕ ПЕРСОНАЛА. От 10 до 40% стоимости биотехнологического продукта составляют затраты на оплату труда персонала. Обычный процесс ферментации и очистки продукта занимает около недели: как правило, процесс постоянно контролируется персоналом, работающим посменно. Объем капитальных затрат на биотехнологическое производство составляет 10^7 – 10^8 евро. Амортизационные отчисления и страховые расходы составляют около 10% капитальных затрат.

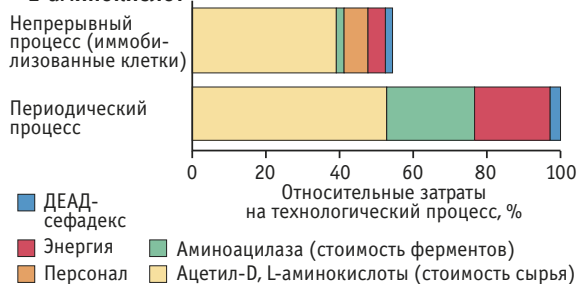
СЫРЬЕ И ЭНЕРГОНОСИТЕЛИ. Основные энергетические затраты связаны с работой систем стерилизации, охлаждения ферментера и перемешивания культуральных жидкостей. Крупные промышленные ферментеры стерилизуют в непрерывном режиме (140 °С, 4 мин). В процессе роста клеток около половины полученной при переработке питательных веществ энергии высвобождается в виде тепла, при перемешивании также выделяется тепло. Для отвода тепла крупных ферментеров используются охлажда-

ющие рубашки или змеевики. В современных производствах система теплообменников позволяет рационально использовать до 90% выделившейся при культивировании микроорганизмов энергии. При проведении ферментации по традиционной технологии 30–60% затрат приходится на закупку сырья, прежде всего источников углерода. В последнее время все большее распространение получают сложные среды, например на основе мелассы или соевого молока. Применение таких сред экономически выгодно, однако их недостатком является непостоянство состава. Мерам стандартизации и контроля качества сырья в промышленности уделяется большое внимание.

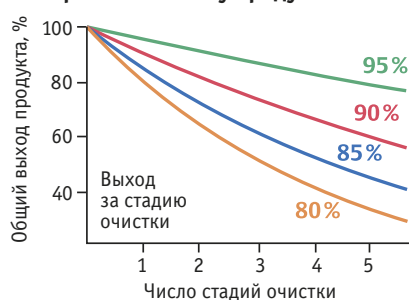
БИОМАССА И ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД. В процессе ферментации образуется биомасса и сточные воды с высоким показателем БПК₅. Например, при производстве лимонной кислоты в реакторе объемом 300 м³ образуется около 15 тонн (сырой вес) клеточной массы *Aspergillus niger*. По экологическим соображениям биомассу, образовавшуюся при ферментации, сжигают. Это достаточно дорогая операция, если учесть высокое содержание воды в клетках. Как правило, продукт ферментации оказывается сильно разбавленным: обычно это раствор, в котором концентрация продукта не превышает 10%. В результате концентрирования и очистки продукта образуется большое количество стоков, загрязненных питательными веществами, сульфатом кальция, растворителями и т. д. Очистка сточных вод вносит значительный вклад в производственные затраты.

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССА. Любой технологический процесс можно разделить на стадии и составить экономическую характеристику каждой стадии. Таким образом, можно установить, какая из стадий требует наибольших затрат, и попытаться ее оптимизировать. Разработаны специальные компьютерные программы, с помощью которых можно учесть практически все сложные экономические взаимосвязи в биотехнологическом производстве.

Основные расходы при производстве L-аминокислот



Затраты на очистку продукта



Промышленное производство лимонной кислоты

Расходные материалы	Производственная стадия	Продукт
	Среда ферментации 284 000 л	
Вода для промывки	Отстаивание	Сырая биомасса (3400 кг сырого веса)
	Фильтрация	
22 000 кг извести [Ca(OH) ₂]	Сепаратор	Оксалат кальция
	Нагревание до 80–90°C, затем до 95°C	
	Фильтрация в ротационном фильтре, осадок – 40 000 л суспензии цитрата кальция	Отходы (фильтрат)
35 000 кг 95% серной кислоты (маточный раствор)	Обработка кислотой	
Вода для промывки	Фильтрация	6000 кг сульфата кальция
	Выпаривание: 67% лимонная кислота	
	Ионообменная хроматография, активированный уголь	
	Кристаллизация	
Вода для промывки	Центрифугирование	Маточный раствор
Горячий воздух	Высушивание	
	Упаковка	40 456 кг безводной лимонной кислоты

Затраты на производство рекомбинантного белка

(получение препаратов человеческого инсулина в клетках *E. coli*, ферментер объемом 35 м³, периодическая ферментация, 24 ч, 25 г инсулина на 1 кг сухого веса клеток, 1 т продукта в год)

Реагенты	Количество, кг/год	Цена, долл. США/кг	Стоимость, долл. США/год	Вклад в стоимость, %
Глюкоза	432 640	0,69	298 520	68,3
Кукурузный экстракт	652 800	0,12	78 336	17,9
Соли	~ 12 000		~ 40 000	8,4
Пеногасители	2 448	4,86	11 897	2,7
Тетрациклин	163,2	55	8 965	2,7
Сырье для ферментации			437 000	100
Гуанидинхлорид (для растворения телец включения)	1 007	2,15	2 165 100	56,4
Карбоксипептидаза В (для расщепления слитого белка)	0,8	1 023,00 (цена 1 г)	818 400	21,3
Муравьиная кислота	262 280	1,25	327 850	8,5
Бромциан	22 848	11,00	251 330	6,5
Другие химикаты			28 000	7,3
Очистка			3 839 000	100

Структура ДНК

ВВЕДЕНИЕ. В процессе размножения происходит передача потомству генетической информации от одной (в случае прокариот – при делении клетки) или двух (у эукариот) родительских клеток. Генетическая информация представлена молекулами ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) – биополимер с молекулярной массой до 10^9 , имеющий структуру двойной спирали. Этот принцип строения ДНК отличается для различных организмов, что делает возможным обмен генетическим материалом между неродственными видами. Примером может служить вирусная инфекция. В последние десятилетия бурно развиваются методы такого гетерологического обмена в лабораторных условиях (методы генетической инженерии). Технология рекомбинантных ДНК открывает новые возможности как в фундаментальных исследованиях, так и в производственных технологиях.

СТРУКТУРА ДНК. ДНК – это линейный биополимер. Его мономерными единицами являются нуклеотиды, состоящие из дезоксирибозо-5'-фосфата и одного из четырех азотистых оснований (аденина (А), гуанина (Г), цитозина (С) или тимина (Т)). Нуклеотиды в ДНК соединены фосфодиэфирными связями таким образом, что фосфатная группа 5'-углеродного атома одного нуклеотида связана с 3'-ОН-группой дезоксирибозы другого нуклеотида. Таким образом, биополимер ДНК представлен сахарофосфодиэфирным остовом с двумя эфирными связями. Две цепи в этом полимере образуют двойную спираль, в которой пуриновые (А и Г) и пиримидиновые (С и Т) основания обращены внутрь молекулы и специфически связаны между собой водородными связями («гибридизация»). Эти водородные мостики могут образовывать между собой только аденин и тимин (две водородные связи) и гуанин и цитозин (три водородные связи), т. е. комплементарными основаниями. Высокомолекулярное соединение ДНК (двойная спираль) обладает рядом характерных свойств. 1) Молекулярная масса ДНК достигает очень больших значений. 2) Расположенные вдоль цепей основания – это носители генетической информации. 3) Цепи ДНК имеют разное направление, так что 5'-конец одной цепи соответствует 3'-концу другой цепи. 4) Каждая цепь молекулы ДНК может служить матрицей для образования новой комплементарной цепи в процессе репликации.

СТРУКТУРА ДНК РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ. Размер и функция ДНК как матрицы для хранения и передачи наследственного материала объясняют наличие особых структурных элементов в организации этой молекулы. У высших организмов ДНК распределена между хромосомами. Так, пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) имеют 16, плодовая муха (*Drosophila melanogaster*) – 4, нематода (*Caenorhab-*

ditis elegans) – 6, а человек – 23 хромосомы. Совокупность ДНК (хромосом) организма называется геномом. Хромосомы находятся в клеточном ядре и формируют структуру, называемую хроматином. Хроматин представляет собой комплекс ДНК и основных белков (гистонов) в соотношении 1:1. Длину ДНК обычно измеряют числом пар комплементарных нуклеотидов (п.н.). Например, 3-я хромосома человека представляет собой молекулу ДНК размером 160 млн п.н.. Выделенная линеаризованная ДНК размером $3 \cdot 10^6$ п.н. имеет длину примерно 1 мм, следовательно, линеаризованная молекула 3-й хромосомы человека была бы 5 мм в длину, а ДНК всех 23 хромосом ($\sim 3 \cdot 10^9$ п.н., $M_R = 1,8 \cdot 10^{12}$) гаплоидной клетки – яйцеклетки или сперматозоида – в линеаризованном виде составляла бы 1 м. За исключением половых клеток, все клетки организма человека (их около 10^{13}) содержат двойной набор хромосом. При клеточном делении все 46 молекул ДНК реплицируются и снова организуются в 46 хромосом. ДНК прокариот устроена более просто: их клетки не имеют ядра, поэтому ДНК находится непосредственно в цитоплазме в форме нуклеоида. Даже такой небольшой геном, как кольцевая ДНК кишечной палочки *Escherichia coli* ($M_R = 2,4 \cdot 10^9$), имеющая размер 4,6 млн п.н., в развернутом виде составляла бы 1,5 мм. Репликация этой молекулы в оптимальных условиях занимает около 20 минут (время удвоения *E. coli*).

Функции ДНК

ВВЕДЕНИЕ. В ДНК содержится информация, определяющая синтез белков и их внутриклеточную локализацию. В прокариотических клетках процесс «перевода» материала ДНК в белок осуществляется в два этапа: сначала происходит транскрипция, т. е. переписывание кодирующего участка ДНК в информационную или матричную РНК (мРНК), а затем трансляция, при которой информация, записанная в мРНК, используется для синтеза белка на рибосоме. У эукариот происходит более сложный процесс. Во-первых, только часть их молекулы ДНК является матрицей для синтеза белков (такие участки называются экзонами). До 90% ДНК не кодирует белков (например, интроны), и функция этих участков неизвестна. После завершения транскрипции ДНК в РНК происходит сплайсинг, т. е. вырезание интронов из первичного транскрипта и «сшивание» экзонов. Транскрипция и сплайсинг происходят в ядре, после чего зрелые мРНК поступают в цитоплазму. Трансляция осуществляется на рибосомах, расположенных в цитоплазме или на поверхности эндоплазматического ретикулаума. Отсюда синтезированные белки направляются в различные внутриклеточные компартменты в соответствии со специфическими сигнальными последовательностями, содержащимися в их структуре. Для функционирования многих белков необходимо, чтобы белок претерпел особые химические модификации (посттрансляционные модификации), например гликозилирование или фосфорилирование. По приблизительным оценкам 30 000–40 000 генов человека кодируют около двух миллионов различных белков. Белковый состав клеток различного типа и возраста сильно различается.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД. Генетический код, позволяющий переводить последовательность нуклеотидов ДНК в последовательность аминокислот, универсален для подавляющего большинства организмов. Каждый триплет нуклеотидов ДНК, а, следовательно, и мРНК, кодирует определенную аминокислоту. Благодаря общим принципам репликации, транскрипции и трансляции клетка может синтезировать белки, закодированные в чужеродной ДНК. В природе это свойство используется вирусами: после попадания в клетку вирусный геном может быть экспрессирован с образованием вирусных белков. Методы генетической инженерии позволяют вводить чужеродную ДНК и осуществлять синтез гетерологичных белков в различных клетках-хозяевах. При этом необходимо учитывать «вырожденность» генетического кода: согласно комбинаторике, из 4 различных нуклеотидов возможно получить $4^3 = 64$ триплета (кодона). В состав белков входят всего 20 аминокислот. Следовательно, каждая аминокислота кодируется более чем одним кодоном, например лейцину соответствуют

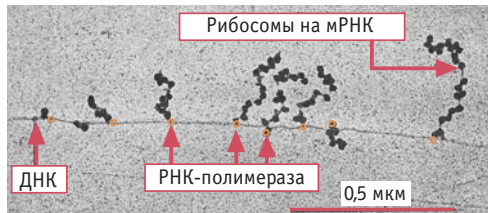
6 кодонов: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA и CUG. У различных организмов частота использования тех или иных кодонов неодинакова, и это часто является причиной неудач при экспрессии клонированных ДНК. В настоящее время установлены структуры геномов многих организмов, использующихся в генетической инженерии, и полученная информация позволяет осуществить гетерологичную экспрессию в соответствии с частотой встречаемости кодонов.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ. Синтетические олигонуклеотиды широко используются в молекулярно-биологических экспериментах, например, в качестве праймеров (затравки для ДНК-полимеразы) и зондов для гибридизации и сайт-направленного мутагенеза. Правильно подобранный праймер специфически гибридизуется с денатурированной ДНК и может служить затравкой для синтеза определенного участка ДНК. Поскольку генетический код вырожден, т. е. каждой аминокислоте соответствуют несколько кодонов, возможно использование нескольких вариантов праймеров для клонирования одного гена. Таким образом, исходя из аминокислотной последовательности белка химическим способом синтезируют все возможные варианты праймеров и проводят гибридизацию исследуемой ДНК со смесью полученных праймеров. Если получен сигнал (методом Саузерна или ПЦР), свидетельствующий о том, что исследуемая ДНК гибридизуется с одним из использованных праймеров, комплекс ДНК–праймер выделяют и определяют структуру ДНК одним из методов секвенирования.

Функции ДНК



* только у ретровирусов
** на рибосомах

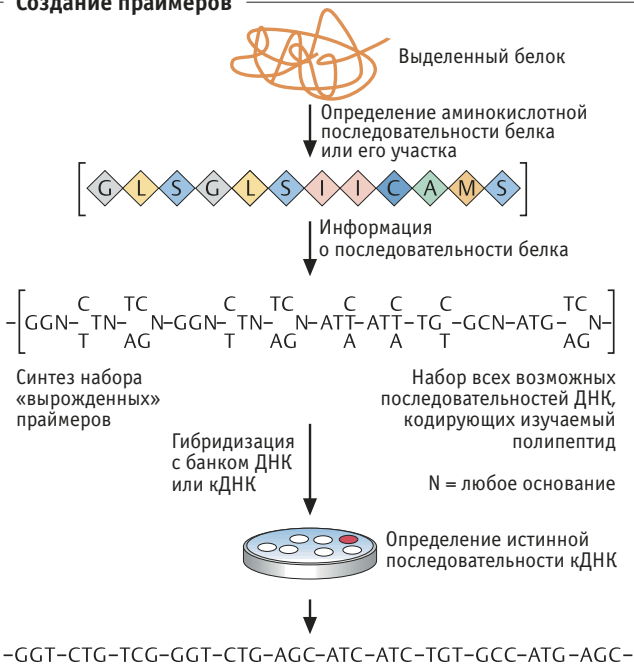


Транскрипция бактериальной ДНК

Генетический код

Аминокислота	Кодон	Аминокислота	Кодон	Аминокислота	Кодон	Аминокислота	Кодон
Фенилаланин (F)	UUU UUC	Серин (S)	UCU UCC	Тирозин (Y)	UAU UAC	Цистеин (C)	UGU UGC
Лейцин (L)	UUA UUG		UCA UCG	Стоп-кодон Стоп-кодон	UAA UAG	Стоп-кодон Триптофан (W)	UGA UGG
Лейцин (L)	CUU CUC CUA CUG	Пролин (P)	CCU CCC CCA CCG	Гистидин (H)	CAU CAC	Аргинин (R)	CGU CGC CGA CGG
Изолейцин (I)	AUU AUC AUA	Треонин (T)	ACU ACC ACA ACG	Аспарагин (N)	AAU AAC	Серин (S)	AGU AGC
Метионин (M)	AUG			Лизин (K)	AAA AAG	Аргинин (R)	AGA AGG
Валин (V)	GUU GUC GUA GUG	Аланин (A)	GCU GCC GCA GCG	Аспарагиновая кислота (D)	GAU GAC	Глицин (G)	GGU GGC GGA GGG

Создание праймеров



Частота использования кодонов некоторых аминокислот у различных организмов

Аминокислота	Кодон	Вероятность использования кодона, %		
Gлц, E	GAG	0,30	0,31	0,59
	GAA	0,70	0,69	0,41
Lys, K	AAG	0,24	0,43	0,60
	AAA	0,76	0,57	0,40
Pro, P	CCG	0,55	0,12	0,11
	CCA	0,20	0,42	0,27
	CCU	0,16	0,31	0,29
	CCC	0,10	0,15	0,33

■ *E. coli*
■ *S. cerevisiae*
■ Человек

Эксперимент в генетической инженерии

ВВЕДЕНИЕ. В генно-инженерных исследованиях применяются очень многие методы. К наиболее часто используемым относятся следующие: 1) выделение ДНК, ее амплификация, различные модификации с помощью ферментов, установление нуклеотидной последовательности ДНК, осуществление химического синтеза ДНК определенной последовательности; 2) клонирование и экспрессия генов в эукариотических и прокариотических клетках.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК, ЕЕ АМПЛИФИКАЦИЯ И ОБРАБОТКА МОДИФИЦИРУЮЩИМИ ФЕРМЕНТАМИ. Количество ДНК в клетке очень мало (одна молекула ДНК на прокариотическую клетку и один или два набора хромосом на эукариотическую клетку), тем не менее ДНК из клеток можно выделить химическими методами, выполнить ее анализа и использовать в дальнейших исследованиях. Как правило, для работы не применяют длинные цепи ДНК, а обрабатывают ее специальными ферментами, которые могут расщеплять ДНК по определенным сайтам, осуществлять ее модификации, соединять фрагменты ДНК, а также переводить ДНК в мРНК. Большинство экспериментов требует достаточно больших количеств ДНК: с помощью автоматических синтезаторов можно получить лишь небольшие фрагменты ДНК, размером до 100 п.н., поэтому особое значение приобретает метод ПЦР, позволяющий амплифицировать фрагменты ДНК размером в тысячи пар нуклеотидов. Важное применение метода ПЦР — рекомбинация между фрагментами ДНК из различных источников, например между ДНК, выделенной из живого организма, и химически синтезированной ДНК.

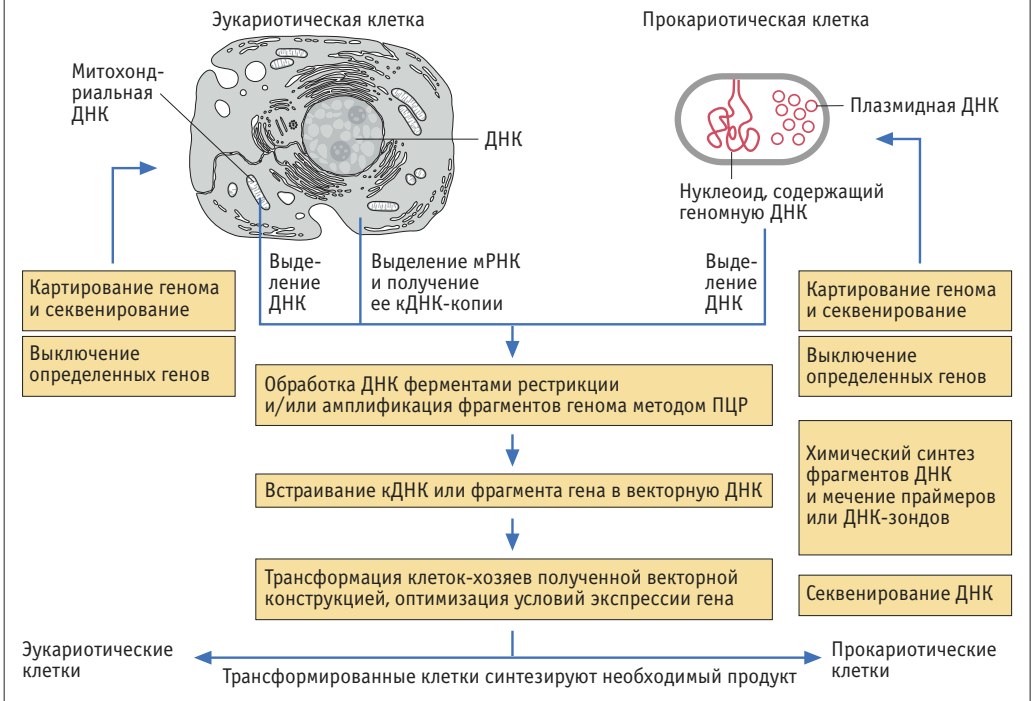
СВОЙСТВА ДНК И СЕКВЕНИРОВАНИЕ. Основные характеристики ДНК: 1) температура плавления (ДНК с большим содержанием пар GC денатурирует при более высокой температуре по сравнению с ДНК, обогащенной парами AT); 2) молекулярная масса (этот параметр устанавливают путем электрофоретического разделения фрагментов ДНК в присутствии фрагментов ДНК известного размера); 3) последовательность нуклеотидов, которую устанавливают путем секвенирования ДНК; 4) белковый продукт или функциональный элемент, закодированный в исследуемой ДНК; 5) взаиморасположение сайтов расщепления эндонуклеазами рестрикции (карта рестрикции).

КЛОНИРОВАНИЕ. Методы, позволяющие выделить из генома прокариот участок, кодирующий определенный белок, также применимы и для эукариот, однако в этом случае необходимо учитывать наличие интронов в большинстве эукариотических ДНК. Зрелую (после сплайсинга) мРНК выделяют из клетки, а затем с помощью фермента обратной транскриптазы (ОТ) в реакции ОТ-ПЦР синтезируют комплементарную цепь ДНК (кДНК). В лабораторной практике при-

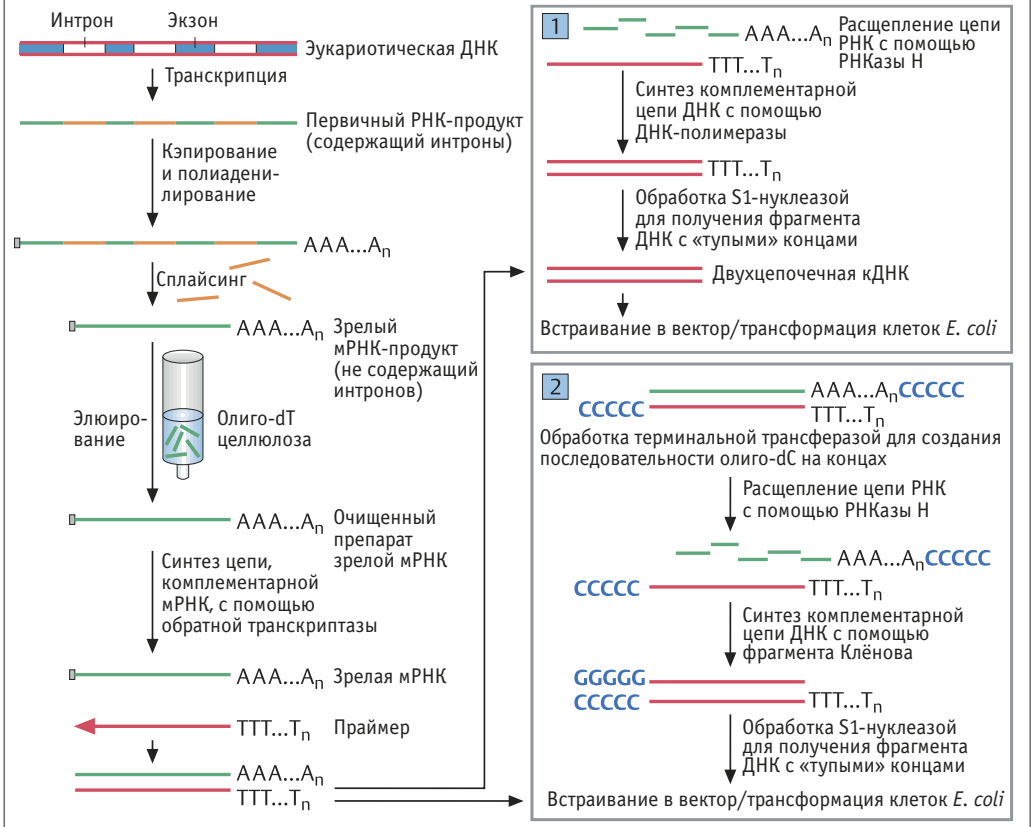
меняют обратные транскриптазы с различными свойствами. Чаще всего используют ДНК-полимеразу, выделенную из *Thermus aquaticus*. Этот фермент, устойчивый при высокой температуре, в присутствии Mn^{2+} действует как обратная транскриптаза, достраивая цепь ДНК на РНК-матрице. После завершения реакции полученный гибридный дуплекс мРНК–ДНК обрабатывают ферментом РНКазой и получают одноцепочечную ДНК, которую можно использовать в качестве матрицы для создания двухцепочечной ДНК в обычной ПЦР. Для неспецифической амплификации эукариотических мРНК используют участок полиаденилирования на 5'-конце мРНК: в качестве затравки для синтеза кДНК на матрице мРНК служит олигомер, состоящий из тимидиновых оснований (polyT).

ЭКСПРЕССИЯ. К настоящему времени разработано несколько методов встраивания ДНК в ДНК другого хозяина. После репликации в процессе клеточного деления происходит транскрипция ДНК, а затем в результате трансляции образуются белки, среди которых и белок, закодированный в клонированном фрагменте ДНК. Совокупность этих процессов называется экспрессией клонированного гена. В качестве клеточных хозяев, как правило, используют бактериальные клетки. Такой выбор обусловлен следующими особенностями бактерий: 1) их геном представлен всего лишь одной двухцепочечной молекулой ДНК; 2) для переноса генетического материала можно использовать фаги или плазмиды; 3) молекулярно-генетические основы организации многих бактерий достаточно хорошо изучены; 4) бактерии быстро размножаются, и в биореакторах можно выращивать очень большие количества бактериальных клеток. Наряду с *Escherichia coli* для клонирования и экспрессии чужеродной ДНК используют и другие бактерии, например *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces*. В последнее время разработаны методы введения ДНК и в эукариотические организмы, такие как дрожжи, грибы, а также в клетки растений и животных.

Основные стадии генно-инженерного эксперимента



Клонирование эукариотических генов



Методы выделения ДНК

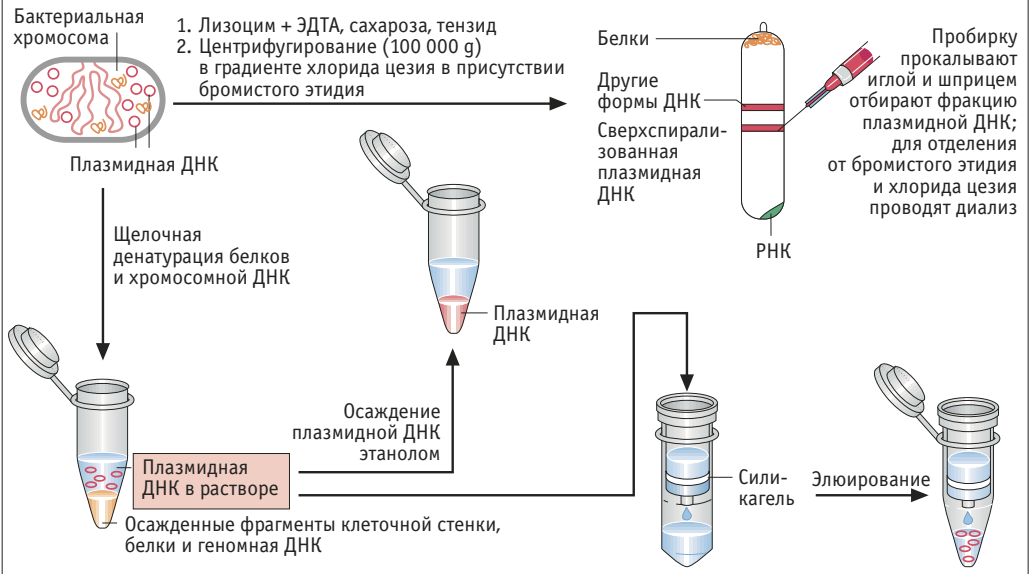
ВВЕДЕНИЕ. Первым этапом большинства генно-инженерных экспериментов является выделение, очистка и характеристика ДНК. Особенно важная роль в анализе и картировании ДНК принадлежит ферментам — эндонуклеазам рестрикции.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК. ДНК в разных организмах и клетках может находиться в различных формах, поэтому существует несколько методов ее выделения. Так, у прокариот молекула ДНК не заключена в ядерную оболочку. Сначала бактериальные клетки обрабатывают ферментом, разрушающим клеточную стенку, затем клеточные белки экстрагируют смесью фенола и хлороформа, а ДНК из растворимой фракции осаждают охлажденным этанолом. Наряду с геномной ДНК в клетке бактерий часто содержатся небольшие по размерам молекулы ДНК — плазмиды. Эта ДНК особенно важна для генно-инженерных экспериментов. Выделение плазмидной ДНК проходит по следующей схеме. После разрушения клеток лизат обрабатывают щелочью, в результате чего белки денатурируют, а геномная ДНК переходит в линейную форму и разбивается на фрагменты. При этом плазмидная ДНК остается замкнутой в кольцо. После центрифугирования денатурированные белки и ДНК осаждаются, а плазмидная ДНК остается в растворе, из которого ее можно осадить спиртом. Для получения более чистых препаратов плазмидной ДНК используют центрифугирование в градиенте плотности сахарозы или хлорида цезия или очищают ДНК с помощью ионообменной хроматографии на анионите. При выделении небольшого количества ДНК (около 20 мкг) метод называется «минипрепаративным», если же получают несколько миллиграммов ДНК, говорят о «препаративном выделении». ДНК фагов выделяют из зараженной бактериальной культуры. Бактерии отделяют центрифугированием, а фаговые частицы из супернатанта осаждают полиэтиленгликолем. Затем белковые оболочки фагов удаляют фенольной экстракцией, а фаговую ДНК осаждают из раствора спиртом. ДНК эукариот распределена между хромосомами в клеточном ядре. Чтобы выделить клеточную ДНК из животных клеток, их лизируют с помощью додецилсульфата натрия (ДСН, или *англ.* SDS), а затем обрабатывают РНКазой и протеиназой К, которые разрушают РНК и белки. Белки и SDS удаляют высаливанием, а ДНК из раствора осаждают спиртом. Обычно в качестве источника кДНК многоклеточных организмов служит сплайсированная мРНК. Ее получают из органов или клеточных культур, в которых находятся исследуемые гены. Для выделения мРНК сначала лизируют ядерную оболочку — от ее фрагментов освобождаются центрифугированием. Супернатант обрабатывают фенолом, чтобы удалить белки, а оставшуюся в растворе ДНК осаждают

спиртом. Митохондрии и пластиды фотосинтезирующих организмов обладают собственной ДНК, репликация которой происходит независимо от хромосомной ДНК. Чтобы получить ДНК митохондрий или пластид, органеллы выделяют методом дифференциального клеточного центрифугирования, затем их разрушают, а ДНК осаждают спиртом.

ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ (РЕСТРИКАЗЫ) нужны бактериальным клеткам для защиты от чужеродной ДНК. В генной инженерии рестриктазы используют для расщепления длинных цепей ДНК на более короткие фрагменты. Фермент узнает специфическую последовательность ДНК (4–10 нуклеотидов) и расщепляет двойную цепь ДНК с 5'- или 3'-конца от сайта узнавания. При этом одни рестриктазы вносят разрывы несимметрично, так что на концах полученных фрагментов образуются короткие одноцепочечные участки — так называемые «липкие» концы. Другие рестриктазы расщепляют цепи ДНК симметрично, и на концах фрагментов образуются «тупые» концы. Стратегической основой любого клонирования или эксперимента по экспрессии чужеродной ДНК является рестриктная карта ДНК. Ее получают, сопоставляя и анализируя размеры фрагментов, полученных при расщеплении исследуемой ДНК различными рестриктазами, или после секвенирования ДНК. Можно рассчитать частоту встречаемости сайта рестрикции в молекуле ДНК. Так, сайт AGCT из 4 нуклеотидов — сайт узнавания рестриктазы *A₁u₁* — теоретически должен встречаться через каждые 256 (= 4⁴) пар нуклеотидов. Однако в природе последовательность ДНК не является статистически однородной, поэтому истинное количество сайтов рестрикции отличается от расчетного. Частота встречаемости определенной последовательности нуклеотидов также зависит от GC-состава ДНК и, следовательно, может служить специфической характеристикой организма.

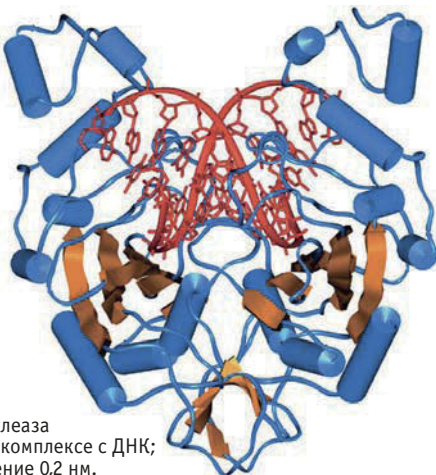
Выделение ДНК



Эндонуклеазы рестрикции

Фермент	Организм, из которого выделен фермент	Сайт узнавания рестриктазой (5' → 3')	Образующиеся концы
<i>Not I</i>	<i>Nocardia oitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC	липкие
<i>Eco RI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	липкие
<i>Bam HI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	липкие
<i>Bgl II</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	липкие
<i>Pvu I</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	липкие
<i>Pvu II</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	тупые
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	AAGCTT	липкие
<i>Hinf I</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _f	GANTC	липкие
<i>Sau 3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	липкие
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	тупые
<i>Taq I</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	липкие

Комплекс ДНК и эндонуклеазы рестрикции



Частота встречаемости сайтов узнавания рестриктазами

Рестриктазы	Частота встречаемости сайтов рестрикции в ДНК фага λ	
	Теоретически	Обнаружено
<i>Bgl II</i>	12	6
<i>Bam HI</i>	12	5
<i>Sal I</i>	12	2

Сайты узнавания трех приведенных здесь рестриктаз содержат шесть нуклеотидов. В геноме фага λ, имеющем размер 49 000 п.н., должно быть 12 сайтов узнавания для этих рестриктаз. Однако в действительности сайты рестрикции встречаются в геноме значительно реже, что свидетельствует о том, что последовательность нуклеотидов ДНК не является статистически однородной.

Ферменты, модифицирующие ДНК

ВВЕДЕНИЕ. Для модификации ДНК *in vitro* обычно используют следующие ферменты: 1) гидролазы – специфически расщепляют ДНК; 2) лиазы – соединяют фрагменты ДНК; 3) синтетазы – достраивают недостающую цепь ДНК на одноцепочечной матрице; 4) модифицирующие ферменты – действуют на 3'- или 5'-концы ДНК.

ГИДРОЛАЗЫ. Наиболее важными гидролазами являются описанные выше эндонуклеазы рестрикции. В настоящее время доступны многие рестриктазы, действующие на различные сайты узнавания, а также различающиеся по свойствам, образуя после рестрикции или «тупые», или «липкие» (с коротким одноцепочечным фрагментом) концы. Другой часто используемый представитель гидролаз – нуклеаза S1, выделяемая из гриба *Aspergillus oryzae*. Этот фермент расщепляет одноцепочечную ДНК, в том числе и одноцепочечные участки (бреши) в двухцепочечной ДНК.

ЛИАЗЫ И ТРАНСФЕРАЗЫ. Чаще всего используется ДНК-лигаза. Этот фермент относится к системе репарации клетки и служит для сшивания разрывов в одно- или двухцепочечных молекулах ДНК. Такие разрывы могут образовываться как в результате случайного повреждения клеточной ДНК, так и в ходе репликации и рекомбинации, поэтому ДНК-лигаза присутствует во всех клетках. В генетической инженерии лигазу используют для создания рекомбинантных молекул ДНК (например, при встраивании фрагмента ДНК в вектор). ДНК-лигаза может сшивать фрагменты как с «липкими», так и с «тупыми» концами, однако лигирование «липких» концов происходит значительно более эффективно, так как между комплементарными участками образуются нековалентные связи. По этой причине перед лигированием «тупые» концы, как правило, превращают в «липкие», используя для этого линкер, адаптор или наращивая концевые гомополимерные последовательности с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (*tailing*). ДНК-лигазу (Т4-ДНК-лигазу) получают из клеток *Escherichia coli*, инфицированных бактериофагом Т4, а терминальную трансферазу – из клеток тимуса теленка.

СИНТЕАЗЫ. Из этих ферментов чаще используется ДНК-полимераза I и обратная транскриптаза. В ходе репликации в клетке *E. coli* ДНК-полимераза I в присутствии праймера взаимодействует с одноцепочечной ДНК и синтезирует комплементарную нить ДНК в направлении 5' → 3'. Этот фермент также обладает 3' → 5'- и 5' → 3'-экзонуклеазными активностями. ДНК-полимераза I узнает короткие одноцепочечные участки в двухцепочечной молекуле ДНК и использует их в качестве матрицы для достраивания. Если удалить концевой фрагмент полипептида размером в 323 аминокислоты, 5' → 3'-нуклеазная акти-

вость ДНК-полимеразы I теряется. Оставшийся фермент, называемый фрагментом Клёнова, обладает полимеразной и 3' → 5'-нуклеазной активностями и может достраивать одноцепочечные «бреши» в двунизовой молекуле ДНК. Обе формы фермента (холофермент и фрагмент Клёнова) используются при проведении радиоактивного мечения ДНК. При проявлении радиоавтограммы те области рентгеновской пленки, которые соприкасались с меченой ДНК, становятся черными. Самым распространенным способом мечения ДНК является достраивание 5'-выступающих концов ДНК с помощью фрагмента Клёнова в присутствии ³²P-меченых нуклеотидов. ДНК-полимеразы термофильных микроорганизмов используют для ПЦР. Обратная транскриптаза – очень важный фермент, обнаруженный у ретровирусов. В качестве матрицы обратная транскриптаза использует РНК и синтезирует на ней комплементарную цепь ДНК. Это свойство используют для получения кДНК-копий матричной РНК. Обратную транскриптазу получают из животных клеток, зараженных ретровирусами: вирусом миобластомы птиц (AMV) или вирусом лейкоза Молони мыши (MMLV).

ФЕРМЕНТЫ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ КОНЦЕВЫЕ ГРУППЫ.

В экспериментах по клонированию часто возникает необходимость ввести или, наоборот, удалить 5'-концевую фосфатную группу. Для осуществления таких реакций существует множество трансфераз и гидролаз.

ПЦР: метод и его практическое применение*

ВВЕДЕНИЕ. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является в настоящее время одним из наиболее широко используемых генетической инженерии. За разработку этого метода Кэри Маллису была присуждена Нобелевская премия. В ходе ПЦР происходит многократное увеличение числа копий специфических фрагментов ДНК. Другими словами, ПЦР позволяет селективно амплифицировать выбранный фрагмент ДНК. Особенно важным применением ПЦР является поиск фрагментов ДНК с определенной последовательностью среди множества фрагментов, полученных в результате генно-инженерных манипуляций.

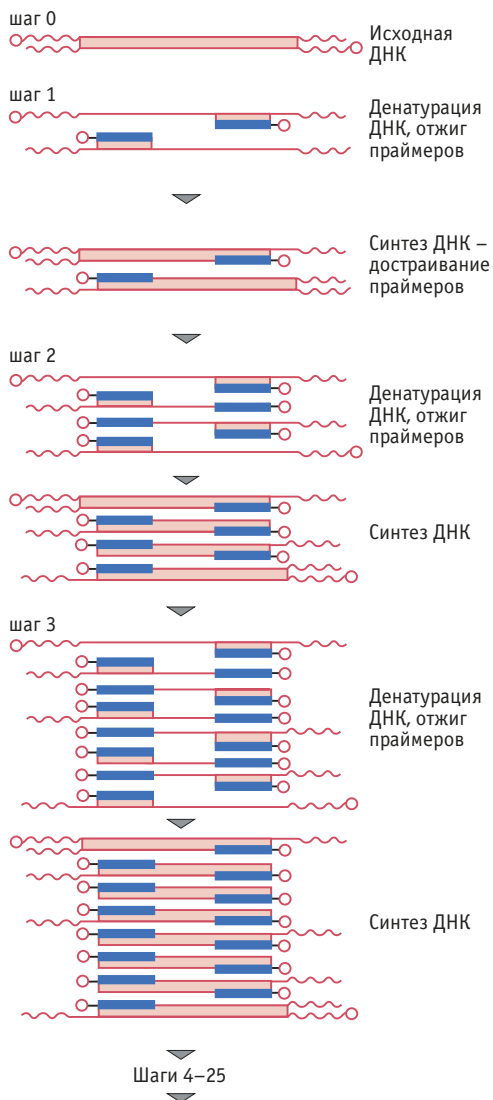
ПРИНЦИП МЕТОДА. Для стандартного проведения ПЦР необходимы два олигонуклеотидных праймера, которые комплементарны 3'-концам участков, ограничивающих выбранный для амплификации фрагмент ДНК. Необходимую для синтеза таких олигонуклеотидов информацию получают либо из результатов секвенирования ДНК, либо путем перевода последовательности аминокислот в последовательность триплетов нуклеотидов (с учетом вырожденности генетического кода). Кроме ДНК-матрицы и праймеров для проведения ПЦР необходима смесь четырех типов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и фермент Т7-ДНК-полимераза. ПЦР осуществляется в три стадии. 1. При 94 °С цепи ДНК расходятся (ДНК денатурирует). 2. При понижении температуры до 40–60 °С праймеры присоединяются к комплементарным им участкам ДНК-матрицы (отжиг праймеров). 3. При повышении температуры до 72 °С происходит синтез новых цепей ДНК (дистраивание праймеров). При последующем повышении температуры до 94 °С новосинтезированные и матричные цепи ДНК снова расходятся, и при охлаждении каждый фрагмент служит новой матрицей для синтеза. В автоматическом режиме каждый такой цикл повторяется 25–40 раз (в зависимости от матрицы один цикл занимает от нескольких секунд до нескольких минут), и за несколько часов количество исходной ДНК достигает 2^{25-40} копий. Повторение циклов ПЦР возможно только в том случае, если используемая ДНК-полимераза сохраняет стабильность при повышенных температурах. Поэтому ферменты для ПЦР получают из клеток термофильных бактерий: *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus* и *Thermotoga maritima* (*Taq*-, *Pfu*- и *Tma*-полимеразы соответственно). Вероятность ошибочного включения нуклеотида (частота мутаций на пару нуклеотидов за цикл удвоения) у *Taq*-полимеразы составляет примерно $8 \cdot 10^{-6}$. Другие названные полимеразы осуществляют более точный синтез ДНК, так как в отличие от *Taq*-полиме-

разы проводят дополнительный контроль правильности синтеза. Молекулярную массу и количество продукта ПЦР определяют методом гель-электрофореза или непосредственно в ходе реакции по увеличению количества метки (на приборе Light-cycler).

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ. С помощью ПЦР можно быстро клонировать и секвенировать выбранные фрагменты ДНК. Как было показано при амплификации фрагмента ДНК, выделенной из одного сперматозоида, метод позволяет работать с единичными молекулами ДНК. Поэтому ПЦР успешно применяется в судебной медицине, археологии и палеонтологии. В клинической диагностике метод ПЦР также находит широкое применение: в настоящее время для многих инфекционных болезней, а также большого числа наследственных патологий уже выявлена связь между последовательностью нуклеотидов в ДНК и наблюдаемой клинической картиной. Обнаружение материала трансгенных растений и выявление возбудителей инфекционных заболеваний – примеры использования ПЦР в анализе пищевых продуктов и экологическом мониторинге. Если известна консервативная последовательность аминокислот, характерная для определенного семейства белков, то, используя соответствующие праймеры, можно осуществлять поиск новых членов этого семейства (обратная генетика). ПЦР можно применять для внесения в ген мутаций: для этого используют праймер, не полностью комплементарный матрице, или искусственно увеличивают вероятность ошибочного включения нуклеотидов в ходе реакции. Матрицей в ПЦР может служить не только ДНК, но и РНК: обратная транскриптаза синтезирует копию РНК – кДНК, которая амплифицируется по стандартной схеме. Этот метод называется ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) и часто применяется при определении количественного соотношения между различными мРНК, а также для обнаружения РНК-содержащих вирусов, например вируса ВИЧ. Техника для проведения ПЦР успешно миниатюризируется: в микросистемах («lab-on-a-chip») возможно увеличить количество образца ДНК в 2^{20} раз менее, чем за час.

* ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков (и др.); под ред. Д.В. Ребрикова. – 2-е изд., испр. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 221 с.; ил.

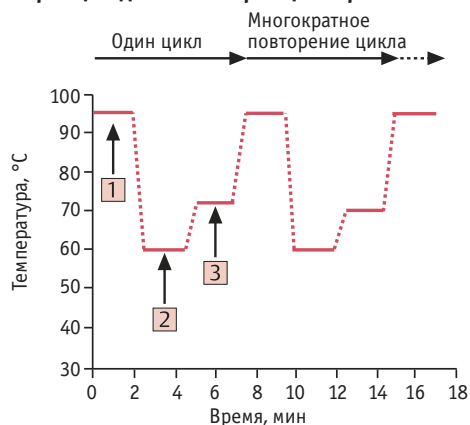
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



Анализ ПЦР-продуктов

Метод	Визуализация результата
Электрофорез в полиакриламидном геле	Молекулы ДНК, связавшиеся с бромистым этидием, светятся в УФ-диапазоне
Электрофорез в агарозном геле	Гибридизация с меченым зондом (Саузерн-блот). Введение радиоактивной метки (например, ³² P). Окрашивание серебром
ВЭЖХ	Анализ в УФ-диапазоне
Гель-электрофорез или ВЭЖХ после расщепления ДНК рестриктазами	См. выше

Принцип действия термоциклера



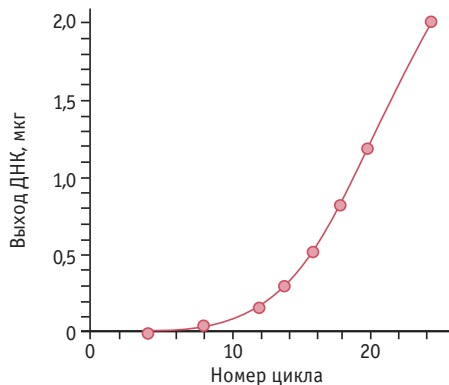
- 1 Шаг 1: денатурация
- 2 Шаг 2: отжиг праймеров
- 3 Шаг 3: достраивание праймеров

Термоциклер

Элемент Пельтье для нагрева и охлаждения



* Реакцию можно одновременно проводить в 96 пробирках



Добавление бромистого этидия или SYBR Green непосредственно в реакционную смесь позволяет наблюдать за увеличением количества продукта ПЦР в режиме реального времени (Light Cycler™)

ПЦР: лабораторная практика

ВВЕДЕНИЕ. Метод ПЦР позволяет применить амплификацию ДНК при решении многих молекулярно-генетических задач. В этом разделе мы рассмотрим следующие примеры применения ПЦР в лабораторной практике: 1) введение в ДНК функциональных элементов; 2) амплификация РНК (ОТ-ПЦР); 3) соединение двух фрагментов ДНК; 4) встраивание новых участков в последовательность ДНК; 5) удаление фрагментов ДНК из гена; 6) осуществление сайт-направленного мутагенеза.

ВВЕДЕНИЕ В ДНК ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ.

Примеры функциональных элементов: сайты узнавания рестриктаз, обеспечивающие более простое клонирование генов, стоп- или старт-кодоны, позволяющие экспрессировать определенные фрагменты белка. К функциональным элементам относятся, кроме того, так называемые tag-последовательности: в результате их трансляции на N- или C-конце белка образуется надстройка из нескольких остатков гистидина. Наличие такой последовательности позволяет быстро выделять белок методом металло-аффинной хроматографии.

КОПИРОВАНИЕ И АМПЛИФИКАЦИЯ мРНК (ОТ-ПЦР).

Амплификация мРНК методом ПЦР возможна в том случае, если известна последовательность хотя бы одного ее конца (такую информацию можно получить, например, определив концевую аминокислотную последовательность исследуемого белка). Сначала синтезируют праймер, комплементарный известному концу мРНК, а затем проводят гибридизацию с выделенной клеточной мРНК. В образовавшемся дуплексе праймер служит в качестве затравки для достраивания кДНК ферментом обратной транскриптазой. Полученную кДНК можно далее амплифицировать методом ПЦР.

СОЕДИНЕНИЕ ДВУХ ФРАГМЕНТОВ ДНК. В первых двух циклах ПЦР происходит независимая амплификация двух фрагментов, которые необходимо объединить. При этом праймеры подбирают таким образом, чтобы образовавшиеся продукты ПЦР содержали идентичные последовательности на участках их слияния. В третьем цикле ПЦР полученные комплементарные участки продуктов гибридизуются, сами продукты служат в качестве матриц, а в реакцию новую среду добавляют концевые (терминальные) праймеры. Так происходит амплификация продукта слияния двух фрагментов. При таком способе соединения ДНК необходимо следить за сохранением рамки считывания триплетов. Между двумя генами вводят так называемый спейсер, кодирующий короткую аминокислотную последовательность (чаще всего это поли-L-аланин), обеспечивающий необходимую подвижность экспрессируемых белков относительно друг друга (например, в случае синтеза антител).

ВВЕДЕНИЕ ИЛИ УДАЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК. Метод введения или удаления фрагментов ДНК аналогичен методу слияния двух генов и требует правильного выбора концевых и внутренних праймеров.

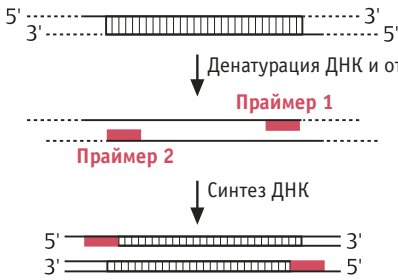
САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ. Мутагенез — это изменение нуклеотидной последовательности гена, которое может приводить к изменению аминокислотной последовательности белка. Направленный мутагенез — очень важный экспериментальный метод при изучении структуры и функции белков. Например, этот метод часто используется при установлении механизма ферментативной реакции или с целью изменения субстратной специфичности фермента в биотехнологических целях. Фрагменты ДНК гибридизуются даже в том случае, если они не комплементарны в одной из позиций, поэтому праймер, несущий замену, отжигается на матрице и служит затравкой для достраивания второй цепи. Другой метод предполагает использование двунитевой плазмиды и двух комплементарных олигонуклеотидных праймеров, несущих замену. С помощью специфической полимеразы *Pfu* происходит амплификация всей плазмиды. В отличие от исходной (природной) ДНК-матрицы полученная в системе *in vitro* ДНК не метилирована, поэтому для удаления исходной ДНК смесь обрабатывают рестриктазой *Dpn I*, которая расщепляет исключительно метилированные молекулы. Оставшуюся ДНК, несущую желаемую мутацию, можно использовать непосредственно для трансформации клеток *E. coli*.

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР. В ходе единственного раунда ПЦР с использованием подходящей комбинации праймеров может быть амплифицировано большее число фрагментов.

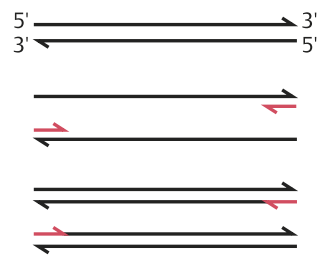
ПЦР С ВЫРОЖДЕННЫМИ ПРАЙМЕРАМИ (ВП).

ВП представляют собой семейство гомологичных по последовательности синтетических одноцепочечных коротких последовательностей, в которых один или несколько нуклеотидов заменены нужным нуклеотидом или дезоксиинозином (dI). dI играет роль «универсального основания», образующего пару с любым другим основанием, и поэтому может быть встроен в структуру праймера, если неизвестна точная последовательность ДНК — например, если доступна только белковая (аминокислотная) последовательность (неопределенное использование кодонов).

Упрощенная схема ПЦР

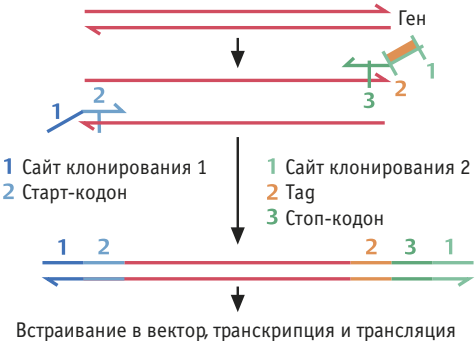


Схематично:

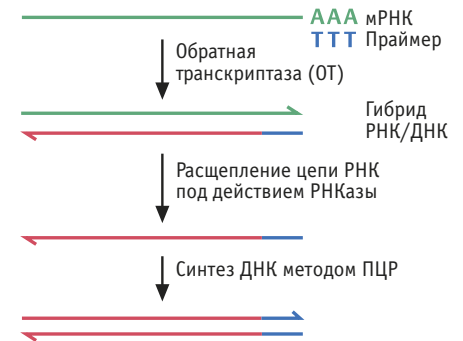


Примеры применения ПЦР

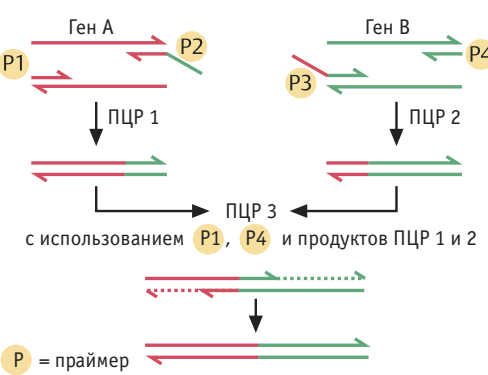
1 Введение функциональных элементов



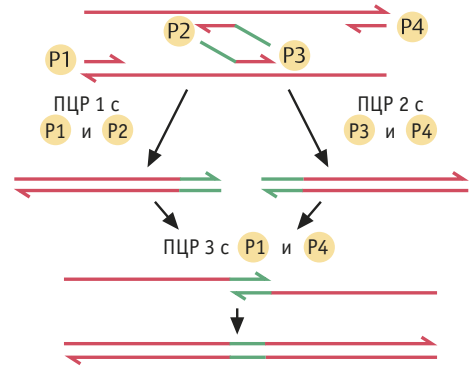
2 Амплификация мРНК (ОТ-ПЦР)



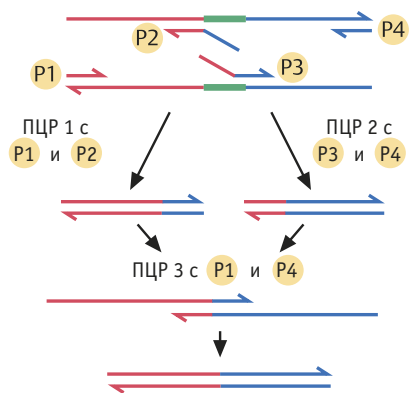
3 Сшивание двух фрагментов ДНК



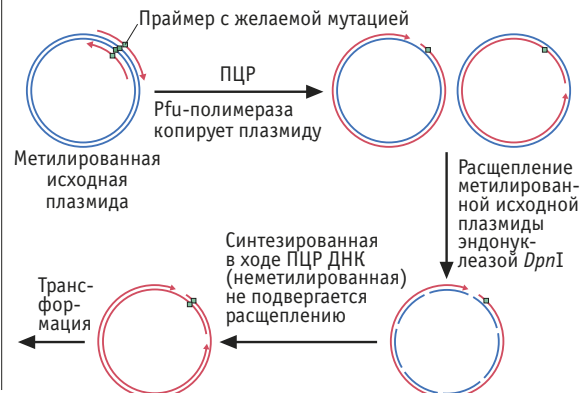
4 Встраивание фрагмента ДНК



5 Удаление фрагмента ДНК



6 Сайт-направленный мутагенез (QuikChange™)



ДНК: химический синтез и определение размера молекул

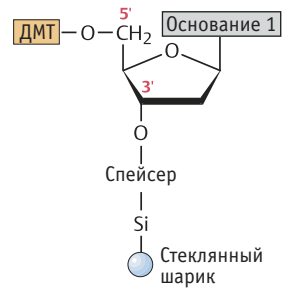
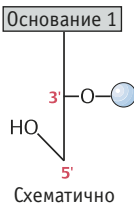
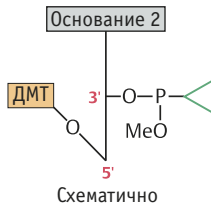
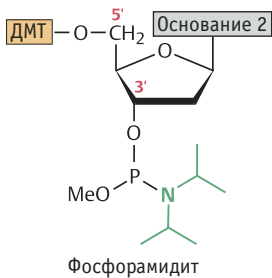
ВВЕДЕНИЕ. Синтез олигонуклеотидов — коротких одноцепочечных фрагментов ДНК размером до 100 остатков — доступен практически в любой современной химической лаборатории. Олигонуклеотиды получили широкое распространение при молекулярно-биологических исследованиях, например, в качестве затравки (*праймера*) для ПЦР. Для определения молекулярных размеров фрагментов ДНК до 30 т.п.н. используют гель-электрофорез, в ходе которого подвижность исследуемого фрагмента сравнивается с подвижностью фрагментов известного размера.

ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ДНК. В настоящее время наиболее распространены фосфорамидитный синтез олигонуклеотидов. Этот метод позволил автоматизировать процесс синтеза. Исходными соединениями являются модифицированные дезоксирибонуклеотиды, у которых 3'-фосфитная группа несет диизопропиламиногруппу, которая в свою очередь защищена метильным остатком, а 5'-гидроксильная группа остатка дезоксирибозы и аминокетильной группы пуриновых и пиримидиновых оснований также блокированы. Такая защита нуклеозидов предотвращает нежелательные реакции в ходе синтеза олигонуклеотида. Первый нуклеозидный компонент, в котором 5'-гидроксильная группа защищена диметокситриэтильной группой, фиксируют на инертном твердом носителе. При снятии защиты с 5'-гидроксила к нему присоединяется следующий нуклеозид в виде фосфорамидита, активированного тетраэолом. Образовавшаяся триэфирная связь нестабильна, поэтому эфир окисляют в присутствии иода до пентавалентного фосфотриэфира. Такой цикл синтеза ДНК, который в отличие от природного процесса происходит в направлении 3' → 5' повторяется, пока не будет получен олигонуклеотид с искомой последовательностью. Затем все защитные группы удаляют, а одноцепочечный олигонуклеотид очищают методом гель-электрофореза или ВЭЖХ. Даже если продуктивность каждого цикла составляет 98%, при синтезе 20-звенного олигонуклеотида только 67% полученных олигонуклеотидов будут иметь нужную длину, а при синтезе 40-звенного фрагмента выход составит лишь 45%. Для синтеза более длинных олигонуклеотидов или целых генов, как правило, используют метод ПЦР. Химически синтезированные олигонуклеотиды широко применяются в молекулярно-биологических экспериментах: 1) для синтеза фрагментов генов или целых генов небольшого размера; 2) в качестве зонда или праймера для идентификации генов или их фрагментов в геномной библиотеке или библиотеке кДНК методами гибридизации или ПЦР; 3) для сайт-направленного мутагенеза; 4) для секвенирования ДНК. Если в лабораторной работе необходимы фрагменты ДНК, значительно превышающие 100 п.н., как правило, обращаются к ус-

лугам специализированных химических фирм, которые гарантируют быстрый, недорогой и точный синтез олигонуклеотидов.

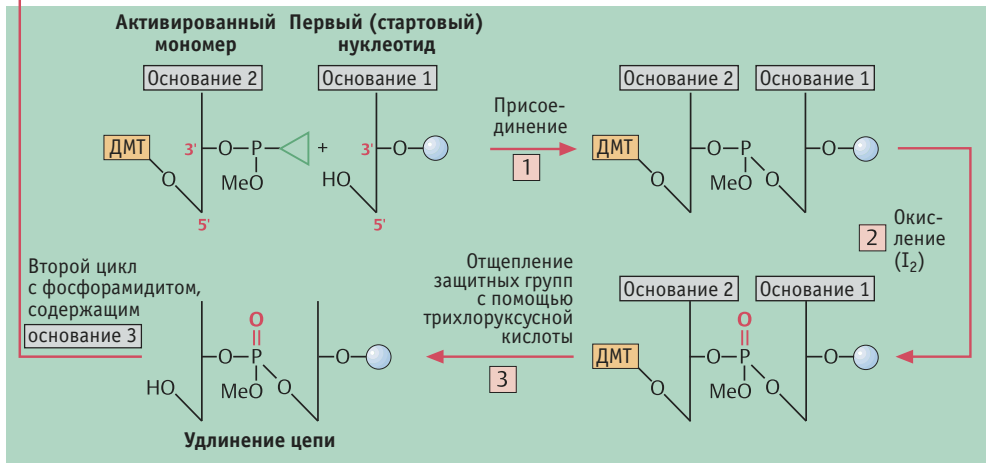
УСТАНОВЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ ДНК. Молекулы ДНК несут отрицательный заряд, поэтому их можно разделять методом электрофореза в геле. Гель, приготовленный из агарозы или полиакриламида или их смеси, обладает пористой структурой (агарозные гели имеют крупные поры, а полиакриламидные — мелкие), поэтому при движении под действием электрического тока фрагменты ДНК в геле разделяются в соответствии с размерами молекул. Сравнивая подвижность исследуемой ДНК с подвижностью ДНК-маркеров известного размера, можно определить размер фрагмента ДНК до 30 т. п. н. Для визуального наблюдения за молекулами ДНК используют бромистый этидий (EtBr) или радиоактивную метку с последующей автордиографией. Бромистый этидий — сильный канцероген, поэтому при работе с ним необходимо строгое соблюдение правил техники безопасности. Чувствительность метода с использованием бромистого этидия составляет около 25 нг (нанogramмов) ДНК. Радиоактивное мечение молекул ДНК с помощью ³²P позволяет повысить чувствительность метода, однако такие исследования можно проводить только в специально оборудованных изотопных блоках. В последнее время получили распространение методы наблюдения за ДНК с использованием флуоресцентных красителей. Чувствительность такого метода, например, с применением SYBR-Green в 25–100 раз превышает чувствительность метода с использованием EtBr, что позволяет определять ДНК в количестве всего 250 пг (пикограммов). После возбуждения флуоресценции в маркерных группах детекцию проводят в фосфоимиджере. Определение ДНК является необходимой процедурой во многих молекулярно-биологических экспериментах, например при проведении рестриктового анализа ДНК или при ПЦР-клонировании генов и их фрагментов из хромосомной, вирусной или плазмидной ДНК.

Твердофазный синтез ДНК



DMT = диметокситритил
Основания: аденин, тимин, гуанин, цитозин

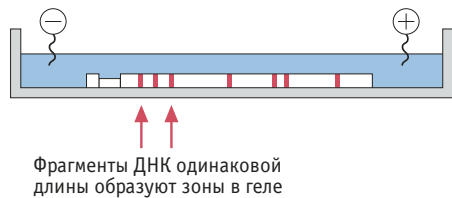
→ 20 или более циклов, затем отсоединение от носителя



Определение молекулярной массы ДНК методом гель-электрофореза

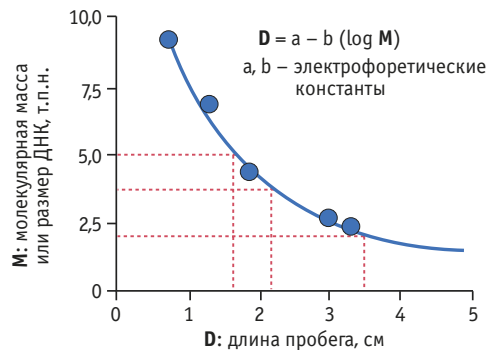
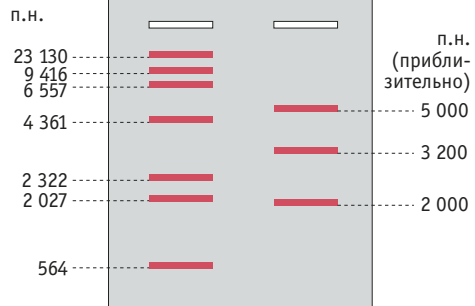


Электрофорез



* Гель состоит из агарозы или полиакриламида.
Для окрашивания ДНК к пробе добавляется бромистый этидий

Маркерная ДНК Проба исследуемой ДНК



Секвенирование ДНК

ВВЕДЕНИЕ. Для определения первичной структуры ДНК используют один из двух методов: метод химического секвенирования ДНК, предложенный Максамом и Гилбертом, или ферментативный метод, разработанный Сэнгером и Коулсоном. Оба метода позволяют секвенировать фрагменты ДНК размером до 600 нуклеотидов. Для определения нуклеотидной последовательности более крупных фрагментов ДНК необходимо получить набор перекрывающихся фрагментов, в совокупности соответствующих длине полной ДНК. Секвенирование целых геномов проводят с использованием автоматических секвенаторов, в которых вместо традиционного радиоактивного меченя применяют флуоресцентную метку. Особое значение имеет сравнение результатов секвенирования с уже имеющимися компьютерными базами данных.

МЕТОД СЭНГЕРА–КОУЛСОНА. Для того чтобы получить исследуемый фрагмент ДНК в одонитевой форме, его встраивают в вектор, созданный на основе генома фага M13. После выделения одноцепочечной ДНК достраивают вторую цепь с помощью фрагмента Клёнова или T7-ДНК-полимеразы. В реакционную смесь добавляют dATP, dTTP, dGTP, dCTP и короткий синтетический олигонуклеотид — *праймер*. Пробу разделяют на четыре части, и в каждую добавляют один из четырех дидезоксинуклеотидов: ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP — для обрыва цепи (после присоединения дидезоксинуклеотида рост цепи прекращается). Концентрацию дидезоксинуклеотидов подбирают таким образом, чтобы полученная смесь представляла собой статистический набор олигонуклеотидов разной длины, заканчивающихся на 3'-конце нуклеотидом, комплементарным соответствующему нуклеотиду в исходной матрице. Разделение продуктов реакции по длине с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) позволяет прочесть всю последовательность нуклеотидов исследуемого фрагмента. Для того чтобы результаты секвенирования можно было зафиксировать на рентгеновской пленке, один из дезоксинуклеотидов, вводимых в реакционную смесь, метят радиоактивным изотопом: ^{32}P или ^{35}S .

МЕТОД МАКСАМА И ГИЛБЕРТА. В современных исследованиях метод химического секвенирования ДНК применяется достаточно редко, однако ранее он широко использовался благодаря своей простоте и надежности. Метод заключается в химической модификации в четырех разных реакциях одного из четырех оснований ДНК и последующем расщеплении сахарофосфатной цепи в местах модификации. При этом образуется набор меченых молекул разной длины, которые разделяют в ПААГ и читают последовательность нуклеотидов на полученной авто-

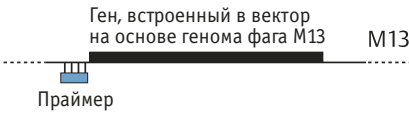
радиограмме. Использование твердофазного процесса и флуоресцентной метки позволило автоматизировать эту методику.

АВТОМАТИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА СЕКВИНИРОВАНИЯ.

В основе современных автоматических секвенаторов лежит метод ферментативного секвенирования по Сэнгеру, в который внесены следующие изменения: 1) для получения одонитевой ДНК проводят реакцию, схожую с ПЦР (асимметричная ПЦР); 2) мечение четырех наборов олигонуклеотидов после наращивания праймера осуществляется не с помощью радиоактивной метки, введенной в дезоксинуклеотиды, а посредством флуоресцентной группы, присоединенной непосредственно к дидезоксинуклеотидам. Если дидезоксинуклеотиды несут разные флуоресцентные маркеры, не требуется проведения четырех различных реакций наращивания праймера, и после разделения фрагментов ДНК по размерам можно сразу считывать всю последовательность нуклеотидов исследуемой ДНК. Размер фрагмента ДНК может составлять до 900 п.н., время одного цикла — примерно 13 ч. Если в автоматическом секвенаторе параллельно проводится анализ 96 проб, эффективность процесса достигает 10 000 п.н. за 15 ч. Использование капиллярного электрофореза еще больше увеличивает скорость анализа ДНК. Секвенирование 96 проб ДНК размером около 650 п.н. в капиллярах занимает всего 3–4 ч и, следовательно, эффективность анализа составляет 400 000 нуклеотидов в день. В настоящее время разрабатываются приборы, содержащие 384 капилляра. Для точного установления нуклеотидной последовательности следует повторить процесс несколько раз, однако даже с учетом многократного повторения секвенирования современные «фабрики», проводящие массовые анализы ДНК с использованием автоматических анализаторов и компьютеров, позволяют за короткий срок секвенировать целые геномы.

Секвенирование по методу Сэнгера–Коулсона

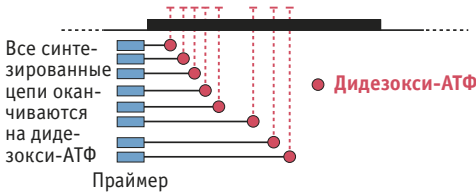
а Гибридизация праймера



ДНК-полимераза, dATP, dTTP, dGTP, dCTP, ³²P- или ³⁵S-dATP для автордиографии

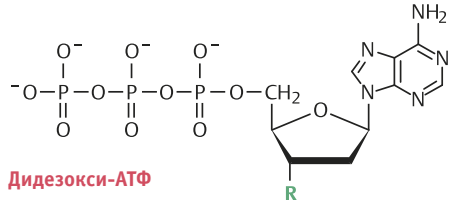
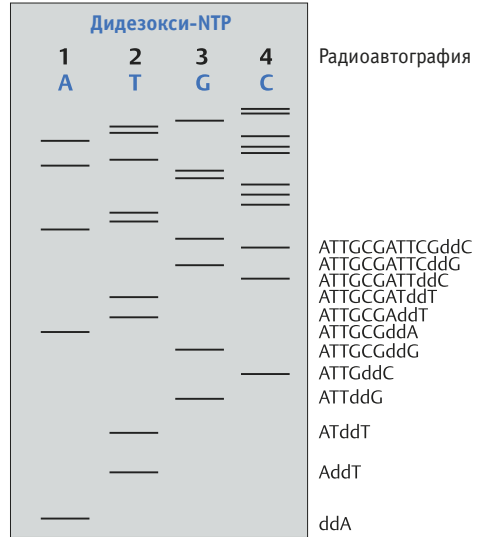
Дидезокси-АТФ

б Синтез цепи (например, первая реакция из четырех): добавляют дидезокси-АТФ



В реакцию 2 добавляют ddTTP, в реакцию 3 – ddGTP, в реакцию 4 – ddCTP

в Гель-электрофорез и радиоавтография

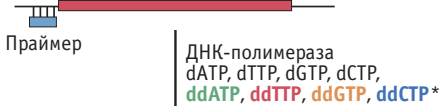


R = OH Дезокси-АТФ (dATP), продолжение синтеза цепи

R = H Дидезокси-АТФ (ddATP), обрыв цепи

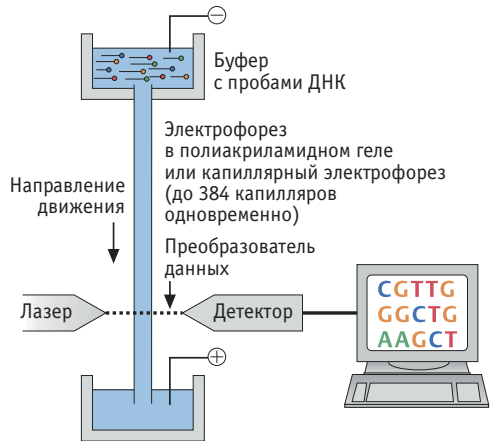
Автоматическое секвенирование

Однонитевая ДНК, полученная в ходе ПЦР



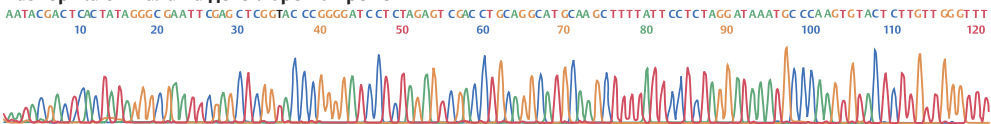
Фрагменты ДНК различной длины, оканчивающиеся на дидезоксинуклеотиды с флуоресцентной меткой

Разделение методом электрофореза и детектирование



* Дидезоксинуклеотиды с различными флуоресцентными метками

Развертка сигнала на детекторе во времени



Введение ДНК в живые клетки (трансформация)

ВВЕДЕНИЕ. В природе чужеродная ДНК может попадать в клетки в нескольких процессах: 1) при переносе ДНК в виде плазмиды, вирусного или фагового генома (конъюгация, трансдукция, инфекция); 2) при передаче ДНК непосредственно в клетки (трансформация). Клетки, получившие чужеродный генетический материал, называются трансформированными. Методами генетической инженерии можно вводить гетерологичную ДНК в клетки.

ПЛАЗМИДЫ. Плазмиды встречаются в основном в бактериальных клетках. Они представляют собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК, которая может встраиваться в хромосому клетки-хозяина или реплицироваться вне ее. В состав плазмиды входит сайт начала репликации, а также один или несколько важных для бактерии генов (например, гены устойчивости к антибиотикам). Плазмидную ДНК несложно отделить от ДНК хромосомы, а затем ее можно подвергнуть обработке ферментами. Таким образом получают векторы для клонирования и экспрессии чужеродных генов. Как правило, плазмидные векторы содержат несколько функционально важных элементов: 1) сайт начала репликации (*ori*), без которого невозможна репликация в клетке-хозяине; 2) иногда в плазмидный вектор встраивают дополнительный сайт начала репликации для размножения в других клетках-хозяевах (*shuttle* – челночный вектор); это позволяет проводить операции с генетическим материалом, используя чаще всего клетки-хозяева *E. coli*, а затем уже модифицированный вектор вводить в клетки исследуемого организма; 3) участок ДНК, содержащий уникальные сайты расщепления рестриктазами (MCS – *multiple cloning sites*); такой «полилинкерный» участок необходим для встраивания клонируемых фрагментов; 4) один или несколько селективных маркеров, позволяющих отличать клетки, несущие плазмиду, от нетрансформированных клеток (например, маркеры, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам или аутокотрофность). Чтобы облегчить поиск трансформированных клеток, в плазмидный вектор встраивают репортерный ген. При так называемом «бело-голубом» скрининге клонов после трансформации плазмидой рUC в качестве репортерного гена служит ген *lacZ'*, так как в ней MCS фланкирован последовательностью гена α -пептида β -галактозидазы (*lacZ'*): в используемых клетках *E. coli* этот ген отсутствует в результате делеции, поэтому только трансформированные клетки способны синтезировать β -галактозидазу. Преимущество этого маркера заключается в том, что на агаре с 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозидом (X-Gal) трансформированные клетки образуют колонии характерного голубого цвета. Появление такой окраски

обусловлено наличием 5,5'-дибром-4,4'-дихлориндиго – продукта расщепления X-Gal β -галактозидазой. В случае встраивания фрагмента в MCS колонии остаются белыми. Относительно небольшого размер плазмидных векторов (обычно не более 10 т.п.н.) облегчает процедуру выделения плазмиды, а также уменьшает вероятность негативной селекции при клеточном делении. Большинство плазмидных векторов разработаны для клеток *E. coli*, однако также имеется ряд плазмид для *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, лактобактерий и других важных для биотехнологии организмов. У эукариот плазмиды встречаются очень редко. В качестве примера можно привести 2-плазмиду дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. На основе Ti-плазмиды почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* созданы векторы для трансформации двудольных растений.

БАКТЕРИОФАГИ И ВИРУСЫ. В природе передача генетического материала клетке-хозяину происходит при вирусной или фаговой инфекции. В лаборатории в качестве векторов используют ослабленные бактериофаги и вирусы, не способные к осуществлению лизиса и других патогенных действий из-за соответствующих модификаций генома. Практически для каждого рода бактерий описаны фаги, специфически инфицирующие только представителей данного рода. Многие из них широко используются в генетической инженерии, в том числе фаги λ и M13, поражающие клетки *E. coli*. Векторы на основе вирусных геномов часто применяют для трансформации животных и растительных клеток, а также при генной терапии человека и животных.

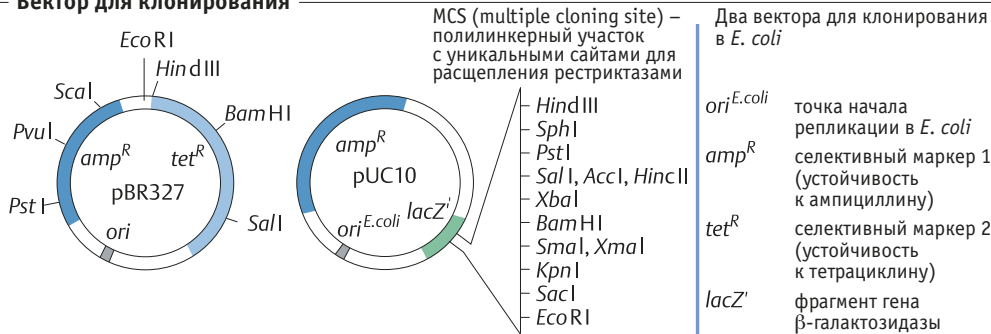
НЕБИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ТРАНСФОРМАЦИИ сочетают в себе химические и физические методы. Выше мы уже рассказывали о трансформации клеток растений. Для трансформации животных клеток, лишенных клеточной стенки, или растительных протопластов* ДНК в виде кальциевой соли осаждают на поверхности клеток, и ее попадание внутрь клетки происходит в результате эндоцитоза. При электропорации под действием короткого электрического импульса в клеточной мембране временно образуются поры, достаточно большие для проникновения молекул ДНК в клетку. Липофекция – способ введения ДНК в клетки, при котором осуществляется слияние клетки с липосомой, содержащей ДНК. Для трансформации эукариотических клеток часто проводят микроинъекцию ДНК непосредственно в клеточное ядро. Как правило, для достижения высокой эффективности трансформации любой из указанных методов требует определенной оптимизации в соответствии с выбранным типом клеток и вектором.

* Протопласт – это растительная или бактериальная клетка без клеточной стенки, но с сохраненной плазматической мембраной. – Прим. переводчика.

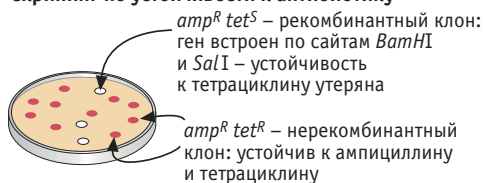
Плазмиды

	Пример	Размер, т. п. н.	Источник
F (фактор фертильности)	F-плазида	95	<i>Escherichia coli</i>
R (фактор резистентности)	RP4	54	<i>Pseudomonas sp.</i>
T (колицин)	ColE1	6,4	<i>Escherichia coli</i>
Плазида деградации	TOL	117	<i>Pseudomonas putida</i>
Плазида вирулентности	Ti-плазида	213	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Вектор для клонирования

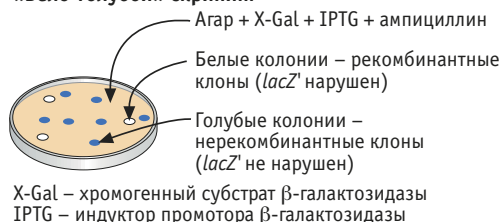


Скрининг по устойчивости к антибиотику

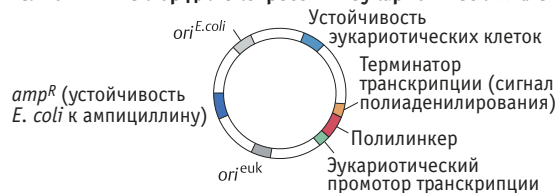


Агар, содержащий ампициллин и тетрациклин

«Бело-голубой» скрининг



Челночный вектор для экспрессии в эукариотических клетках



ori^{E.coli} точка начала репликации в *E. coli*

amp^R селективный маркер (устойчивость *E. coli* к ампициллину)

ori^{Euk} точка начала репликации для эукариот (например, плазмиды размером 2 мкм в *S. cerevisiae* или вируса SV-40 в животных клетках)

Небиологические методы трансформации

Эндоцитоз



Липофекция

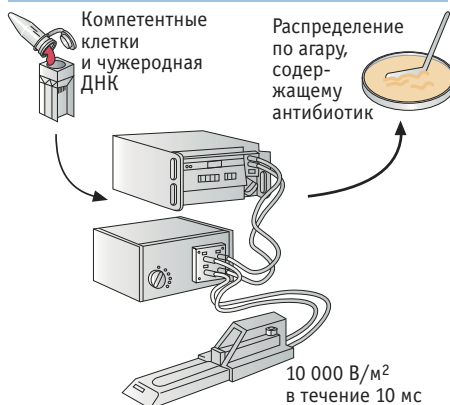
Перенос ДНК в клеточное ядро



Микроинъекция



Электропорация



Идентификация и клонирование генов

ВВЕДЕНИЕ. Информацию о нуклеотидной последовательности гена, кодирующего тот или иной белок, можно получить, проводя анализ аминокислотной последовательности этого белка. Для клонирования генов с известной нуклеотидной последовательностью используют метод ПЦР. Для идентификации гена, кодирующего определенный белок, создается геномная библиотека, а затем проводится скрининг клеток, несущих нужную нуклеотидную последовательность, например по наличию в этих клетках специфической мРНК или по иммунологической реакции продукта.

КЛОНИРОВАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПЦР. Если имеется полная информация о нуклеотидной последовательности исследуемого гена или аминокислотной последовательности его продукта, можно выбрать последовательность синтетических праймеров, предназначенных для гибридизации с ДНК на концах гена. Обычно праймеры выбирают так, чтобы полученный после амплификации фрагмент ДНК содержал сайты рестрикции для последующего встраивания в экспрессирующий вектор.

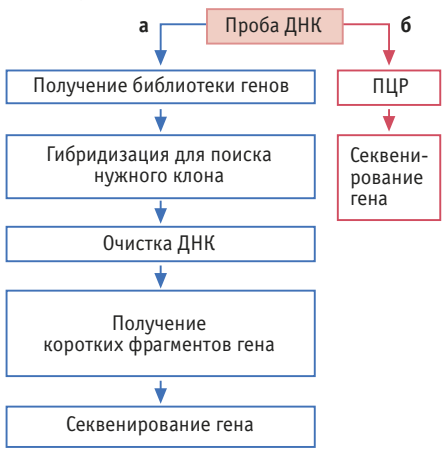
КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК НЕИЗВЕСТНОГО СТРОЕНИЯ. Когда строение гена, кодирующего исследуемый белок, неизвестна, создают библиотеку генов организма. Для этого всю геномную ДНК разрезают на несколько фрагментов, встраивают их в векторы и проводят трансформацию. В качестве клеточных хозяев для создания геномной библиотеки можно использовать бактерии, культуры животных или растительных клеток. Маркерным геном для селекции трансформированных клеток может быть ген устойчивости к антибиотику. Способ отбора клонов, содержащих искомым ген, зависит от природы гена. Например, если ген может восполнять ауксотрофную мутацию в штамме-хозяине, клетки высевают на минимальную среду (лишенную вещества, необходимого для роста мутантного штамма), на которой выживают только те клетки, в которых содержится ДНК с исследуемым геном. Часто применяют систему из двух маркерных генов: один ген служит для отбора трансформированных клеток, а другой, содержащий в себе сайты для клонирования, — для отбора тех клеток, в которых вектор содержит вставку чужеродной ДНК. Встраивание фрагментов ДНК приводит к появлению нового фенотипа, т. е. к потере маркерного признака, например устойчивости к антибиотику. После предварительного отбора проводят дальнейший анализ клонов, несущих исследуемый ген.

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ И ГЕННЫХ ПРОДУКТОВ. Методы идентификации можно условно разделить на две группы: первые основаны на гибридизации ДНК со специфическими ДНК- или РНК-зондами, а вторые — на анализе белковых продуктов экспрессии гена. При поиске интересующего гена

часто проводят гибридизацию ДНК (в одноцепочечном состоянии) с ДНК-зондом, меченным радиоактивной или другой меткой (саузерн-блот). Другим методом обнаружения клонированного гена является гибридизация продукта транскрипции гена — мРНК — со специфическими ДНК- или РНК-зондами (нозерн-блот). Указанные методы применимы лишь в том случае, когда известна нуклеотидная последовательность гена, однако на практике часто возникает ситуация, когда структура клонированного гена неизвестна. В таком случае из ДНК-фрагментов геномной библиотеки выбирают те участки, экспрессия которых приводит к образованию исследуемого белка. Отбор клонов, в которых происходит синтез белка, проводят с помощью специфических антител (вестерн-блот). Иммуная реакция с антителами, как правило, позволяет обнаружить не только полноразмерный белок, но и его фрагменты, что особенно важно, если в процессе создания библиотеки анализируемый ген был разделен на несколько фрагментов и оказался в двух или нескольких клонах. Описанный способ позволяет обнаружить гены, которые кодируют определенные белки. Для поиска в составе ДНК регуляторных элементов (промоторов и др.) используют векторы, несущие непосредственно за полилинкером, в который встраивается фрагмент, репортерный ген, например ген люциферазы. Клонированный промоторный участок можно обнаружить по наличию экспрессии репортерного гена.

ДРУГИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ. В последнее время для поиска гетерологичной ДНК с известной последовательностью часто применяют метод ПЦР с использованием праймеров, специфичных для данного гена. В случае, когда структура ДНК неизвестна, ее поиск осуществляют, сравнивая результаты рестриктового анализа ДНК из интактных и трансформированных клеток.

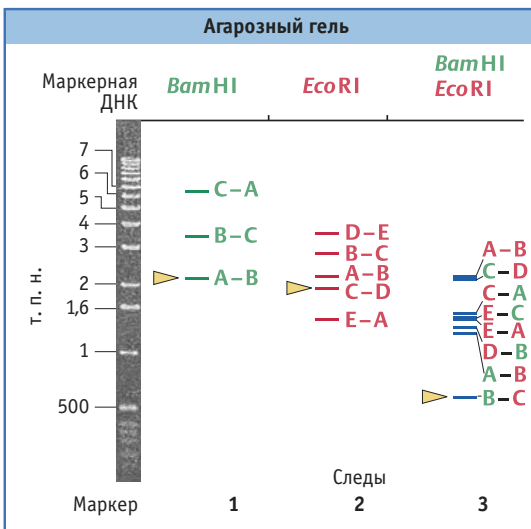
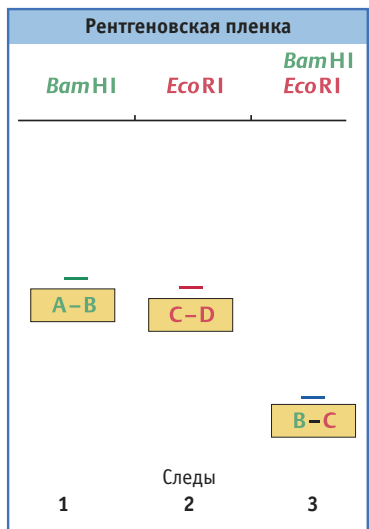
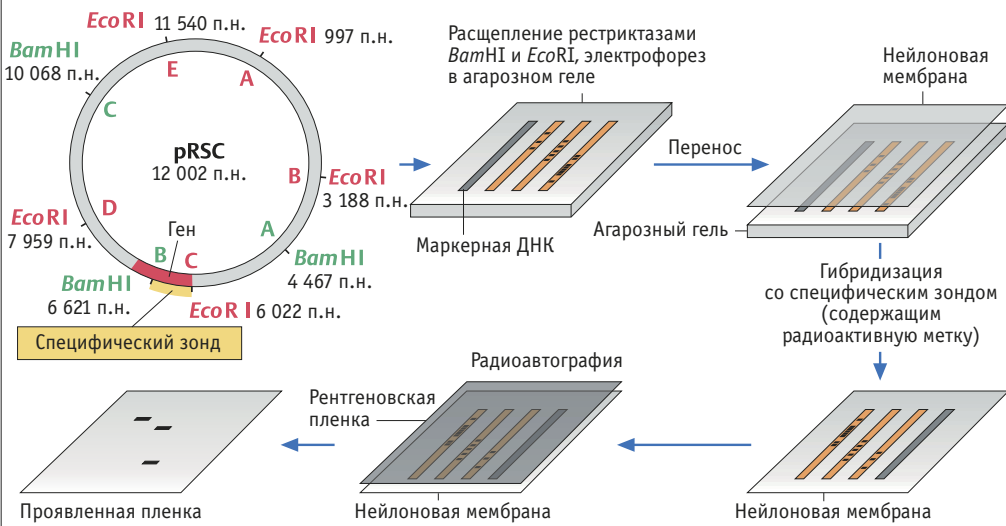
Клонирование генов



Методы идентификации

Саузерн-блот	Поиск ДНК	Гибридизация с меченым ДНК- или РНК-зондом
Нозерн-блот	Поиск мРНК	Гибридизация с меченым ДНК- или РНК-зондом
Вестерн-блот	Поиск белка	Иммуноанализ с мечеными антителами
Использование репортерных групп	Поиск регуляторных элементов	Экспрессия репортерных белков

Саузерн-блот



Экспрессия генов

ВВЕДЕНИЕ. Основной целью большинства биотехнологических исследований является экспрессия генов или целых оперонов (нескольких генов, транскрибируемых с образованием одной молекулы мРНК). Для экспрессии в клетки вводят вектор. В зависимости от выбора клеток-хозяев вектор может реплицироваться вне хромосомы (например, у бактериальных клеток, в том числе *E. coli*) или встраиваться в хромосому хозяина (практически во всех эукариотических системах). Наличие индуцибельного промотора для клонированного гена позволяет «включать» и «выключать» экспрессию гена путем изменения условий. В случае высших организмов (растений и животных) к гену часто добавляют последовательности ДНК, кодирующие специфические сигнальные последовательности аминокислот. Такие последовательности обеспечивают транспорт генного продукта в определенные клеточные компартменты или направляют его по пути экзцитоза.

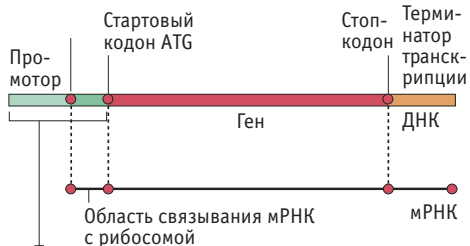
ВЕКТОРЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ. Вектор, предназначенный для экспрессии в прокариотических клетках, например в *E. coli*, кроме клонированного структурного гена или оперона содержит сайт начала репликации и ген устойчивости к антибиотикам. Экспрессия, т. е. образование, гена является результатом действия целого ряда регуляторных факторов и соответствующих белков – ферментов и факторов транскрипции и трансляции. В клетке *E. coli* фермент РНК-полимераза, осуществляющая транскрипцию, связывается с регуляторным участком – промотором, для которого характерно наличие определенных консервативных последовательностей в области –35 и –10 нуклеотидов до сайта инициации транскрипции, и начинает транскрипцию гена. Транскрипция заканчивается, когда РНК-полимераза достигает участка ДНК, где расположен терминатор транскрипции, обеспечивающий во многих случаях образование шпильки в синтезируемой мРНК. Для эффективной экспрессии обычно выбирают индуцибельные промоторы. Так, промотор лактозного оперона *E. coli* активируется (индуцируется) при добавлении в среду индуктора – изопропилтио-β-D-галактозида (IPTG). Индуктор взаимодействует с белком – репрессором лактозного оперона – и предотвращает его связывание с ДНК, при этом освобождается место для РНК-полимеразы, и транскрипция возобновляется. В настоящее время разработано много векторов для экспрессии. Все они содержат так называемые полилинкерные участки, в которых находятся уникальные сайты рестрикции, удобные для встраивания генов.

ВЕКТОРЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ имеют такую же структуру, как и векторы для экспрессии в прокариотах, и содержат следующие функциональные элементы: генетический маркер,

обеспечивающий селекцию трансформированных клеток, индуцируемый эукариотический промотор с консенсусными последовательностями (ТАТА-, ССААТ- и GC-боксами), сайт инициации транскрипции (стартовый кодон АТГ), сайт терминации транскрипции, сигнал полиденитрирования мРНК и полилинкер для встраивания генов. Полученные генные продукты могут направляться в различные клеточные компартменты благодаря наличию специфических сигнальных последовательностей. Векторы для экспрессии в эукариотических клетках редко реплицируются автономно: как правило, они встраиваются в хромосому хозяина в результате рекомбинации. Чтобы осуществлять отбор трансформированных клеток млекопитающих, в вектор встраивают селективные маркерные гены, например ген дигидрофолатредуктазы или неомицинфосфотрансферазы. В среду роста клеток после трансфекции добавляют токсичные соединения метотрексат или неомицин. Нетрансформированные клетки не могут расти в присутствии этих соединений, а клетки, несущие вектор, и, следовательно, способные инактивировать токсины, выживают. Для отбора клеток с большим числом копий вектора увеличивают концентрацию токсинов в среде.

ПРОМОТОРЫ. В зависимости от уровня экспрессии гена (т. е. количества образующегося белкового продукта) различают сильные и слабые промоторы. Для многих естественных промоторов описано явление «подтекания» – наличие невысокого уровня экспрессии даже в присутствии репрессора. В генно-инженерных экспериментах обычно выбирают «неподтекающий» индуцибельный промотор необходимой силы, что позволяет, изменяя условия роста клеток, полностью подавлять или включать экспрессию гена. Типичными для экспрессии в клетках *E. coli* являются *lac*-, *trp*- и *tac*-промоторы, которые можно индуцировать добавлением специфических реагентов в среду роста бактерии. Экспрессия генов, встроенных под промотор λP_L , индуцируется при повышении температуры от 30 до 42 °С. Для клонирования и экспрессии генов в грибах используют галактозный промотор GAL10 (*Saccharomyces cerevisiae*), промотор алкогольоксидазы АOX (*Pichia pastoris*) или промотор глюкоамилазы (*Aspergillus*). Промотор металлотионеина часто выбирают для экспрессии генов в животных клетках. При работе с трансгенными растениями и животными удобно использовать промотор, который регулируется процессами, протекающими в организме-хозяине. Например, в экспериментах с трансгенными животными исследуемый ген часто встраивают под сильный промотор, специфический для молочных желез. Индукция экспрессии гена происходит при лактации, и таким образом удается получать достаточно большие количества рекомбинантного белка непосредственно из молока.

Вектор для экспрессии



а *E. coli*

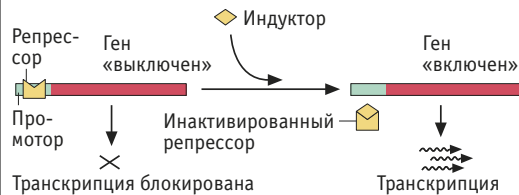
..... TTGACA TATAAT → Ген
 -35 нуклеотидов -10 нуклеотидов

б Животные клетки

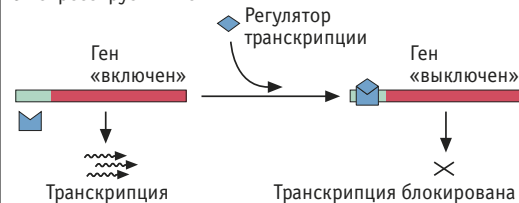
..... различные сигналы TATATAT → Ген
 -25 нуклеотидов

Индукция и репрессия

а Индуцируемый ген



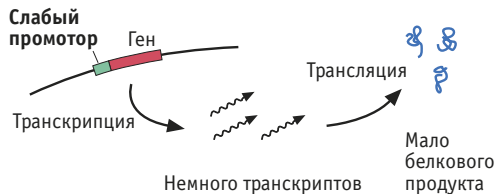
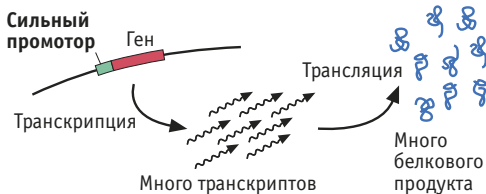
б Репрессируемый ген



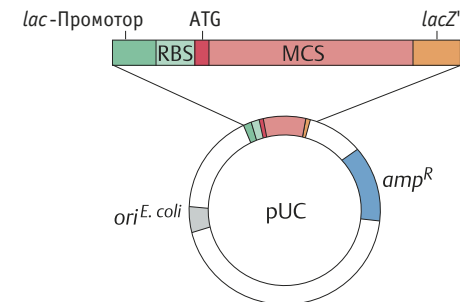
Примеры индуцибельных генов

Промотор	Белок	Индуктор	Организм-хозяин
<i>lacZ</i>	β-галактозидаза	Изопропилтио-β-D-галактозид (IPTG)	<i>E. coli</i>
λP_L	–	Повышение температуры с 30° до 42°C	<i>E. coli</i>
<i>GAL10</i>	GAL10	Галактоза	<i>S. cerevisiae</i>
<i>AOX</i>	Алкогольоксидаза	Метанол	<i>Pichia pastoris</i>
Промотор металлотIONEИНА	МеталлотIONEИН	Ионы Zn ²⁺	Культуры животных клеток

Промоторы

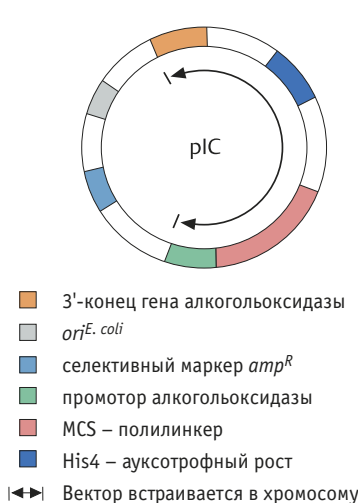


Кассета для экспрессии в *E. coli*



- RBS сайт связывания рибосомы
- ATG стартовый кодон
- последовательность *lacZ'* для «бело-голубого» скрининга
- MCS полилинкер
- селективный маркер
- oriE. coli* точка начала репликации в *E. coli*

Кассета для экспрессии в *Pichia pastoris*



Выключение генов

ВВЕДЕНИЕ. Направленное выключение генов является важным инструментом для фундаментальных исследований. Удаление нежелательных признаков необходимо при выведении улучшенных сортов растений, в животноводстве, в медицине (например, при противораковой терапии), а также при получении новых штаммов микроорганизмов для биотехнологического производства. Наряду с ненаправленным мутагенезом в результате действия мутагенов или облучения клеток существуют современные методы генетической инженерии, позволяющие проводить направленное выключение генов на уровне ДНК (*gene silencing, knock-out*) или РНК (*anti-sense RNA*).

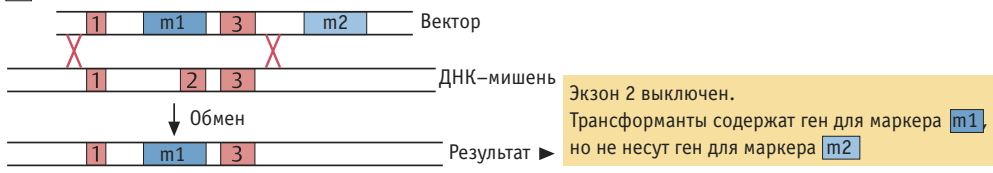
ВЫКЛЮЧЕНИЕ ГЕНОВ (KNOCK-OUT) ПУТЕМ КЛОНИРОВАНИЯ ДНК. Векторы для трансформации животных и растительных клеток, которые реплицируются вне хромосомы, встречаются очень редко. Как правило, они встраиваются в хромосому в процессе рекомбинации. Это свойство используется для выключения определенного гена: ДНК-вектор имеет участок, частично гомологичный кодирующей области исследуемого гена, однако из-за мутации или делеции не кодирующий полноценный белок. В результате рекомбинации ген с нарушенной экспрессией встраивается в хромосому. Оптимальная длина вставки фрагмента ДНК для осуществления рекомбинации составляет около 150 п.н. Рекомбинация – процесс, протекающий с низкой вероятностью ($< 10^{-3}$), поэтому необходима система селекции, аналогичная маркерному гену в прокариотических клетках. В клетках млекопитающих селективными маркерами часто служат гены, обеспечивающие способность роста на средах с токсичными веществами, например при экспрессии гена дигидрофолатредуктазы клетки выращивают на среде с метотрексатом.

«АНТИСМЫСЛОВАЯ» РНК – это РНК с последовательностью, комплементарной специфической мРНК. Ген, который необходимо выключить, встраивают в экспрессирующий вектор в обратной ориентации, а затем полученную конструкцию используют для трансформации. Образующаяся в результате транскрипции такого вектора мРНК (антисмысловая РНК, асРНК) комплементарна мРНК исходного гена, и из-за образования дуплекса мРНК–асРНК синтез генного продукта прекращается. Причина остановки трансляции, вероятно, заключается в том, что этот дуплекс не может взаимодействовать с рибосомой. Другой причиной подавления синтеза белка может быть быстрая деградация дуплекса под действием внутриклеточных рибонуклеаз. Описанный метод выключения генов может иметь интересное приложение в медицине. Если причиной заболевания является нарушение в регуляции синтеза какого-то гена, выключение этого гена может оказаться более эффективным, чем замена гена методами ген-

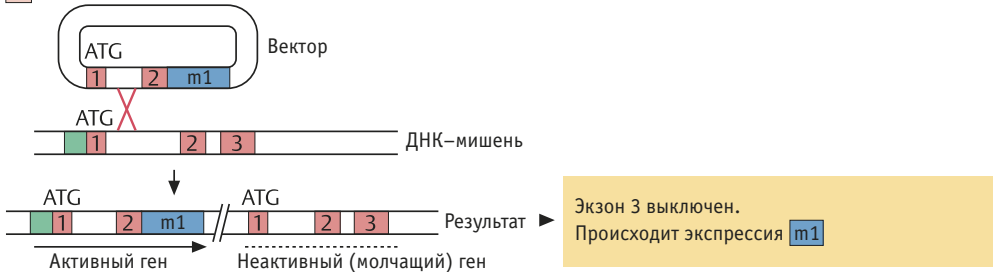
ной терапии. Действительно, в экспериментах с животными было показано, что развитие опухоли головного мозга (глиомы) прекращается, если клетки трансформировать с антисмысловой кДНК инсулиноподобного фактора роста 1. Клетки опухоли синтезируют этот гормон в избыточном количестве, и прекращение синтеза приводит к подавлению патологического процесса. В этих экспериментах использовали эписомальный экспрессирующий вектор, в котором ген в обратной ориентации находился под контролем металлотионеинового промотора. Беспокойство у экологов вызывает также вероятность горизонтального распространения устойчивости к антибиотикам в результате генетических манипуляций. Совершенно новая концепция применения асРНК предполагает введение асРНК путем инъекции. В организме РНК быстро деградирует под действием рибонуклеаз, поэтому особый интерес вызывают устойчивые соединения – аналоги РНК (например, фосфотионаты). Многие препараты, содержащие асРНК, сейчас находятся на стадии клинических испытаний, в том числе препарат для орального применения против хронического энтерита и различные противовирусные препараты. Недавно было показано, что в этих явлениях играют определенную роль фрагменты ДНК, связанные с РНК-интерференцией и малыми интерферирующими РНК. Другим примером успешного применения антисмысловой РНК является создание томатов сорта FlavrSavr™, которые хранятся в течение длительного времени. Показано, что размягчение плодов при хранении обусловлено активацией генов, кодирующих фермент полигалактоуридазу. Экспрессирующий вектор на основе Ti-плазмиды сконструировали таким образом, что участок гена, кодирующего этот фермент, был встроен в обратной ориентации и оказался под контролем промотора вируса табачной мозаики. Полученный вектор ввели в клетки растения, а затем по результатам саузерн- и нозерн-блоттинга сделали вывод о том, что вектор интегрировался в геном. В трансформированных растениях интенсивность синтеза полигалактоуридазы была значительно снижена, и плоды сохранялись длительное время в обычных условиях. Аналогичная стратегия эксперимента позволяет получать растения, устойчивые к вирусным инфекциям. Для этого используют асРНК, комплементарную РНК белка капсида вируса. В качестве генетического маркера трансгенные растения несут ген устойчивости к антибиоту. Противники трансгенных организмов предупреждают об опасности возникновения аллергических реакций на новые генные продукты при употреблении трансгенных организмов в пищу, а также распространения гена устойчивости к антибиоту в природных системах путем горизонтального переноса.

Выключение генов (*knock-out*)

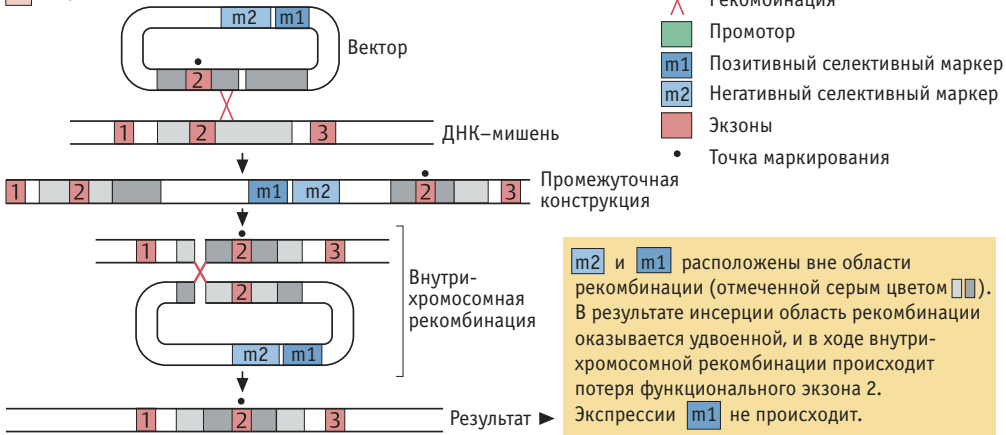
1 Позитивно-негативная селекция



2 Инактивация в результате встраивания (инсерция)



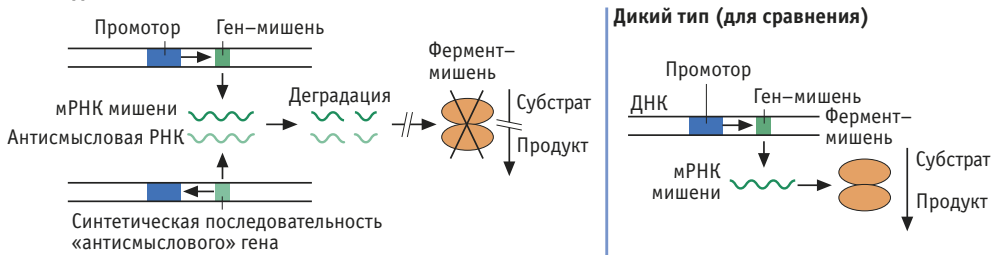
3 Встраивание и выщепление



Эукариотические селективные маркеры

Маркер	Тип клеток	Индикатор
Рецессивный: аденозиндезаминаза	Мутантные линии клеток CHO	9-β-Ксилофураноксил
Доминантный: дигидрофолатредуктаза	Любые	Метотрексат
Слитый белок: неоминфосфотрансфераза и тимидинкиназа	Любые	Неомицина сульфат
Металлотионеин I	Любые	Cd ²⁺ , Zn ²⁺

Метод антисмысловой РНК



РНК

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время считается почти доказанным, что геном на основе ДНК, генетическая основа современной биосферы, был производным простейшей жизненной формы, у которой репликация происходила при помощи РНК. И сегодня РНК играет важную роль в жизнедеятельности клетки, находясь в форме рибосомной, транспортной и информационной РНК. В биотехнологии РНК применяют для следующих целей: 1) для создания аптамеров (лигандов с высоким сродством), 2) для биосинтеза токсичных белков в условиях *in vitro*, 3) как вектор в генной терапии и 4) как *интерферирующая* РНК при *нокауте* генов.

АПТАМЕРЫ — это искусственно полученные фрагменты ДНК или РНК, которые обладают высоким сродством к гидрофильным молекулам (белкам, лекарственным препаратам). Методом SELEX (систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении) проводят оценку способности к связыванию целевых молекул среди обширной библиотеки синтетических молекул ДНК или РНК (до 10^{14} – 10^{15} различных последовательностей). Наилучшие кандидаты подлежат амплификации методом ПЦР–РВ и транскрипции *in vitro* для получения дочерней библиотеки с улучшенными свойствами. Аптамеры позволяют добиться стабильного связывания даже в наномолярном диапазоне концентраций. Разработка аптамеров для диагностических и терапевтических целей преследует значительный коммерческий интерес: аптамер-зондирование для протеомного анализа (SomaLogic).

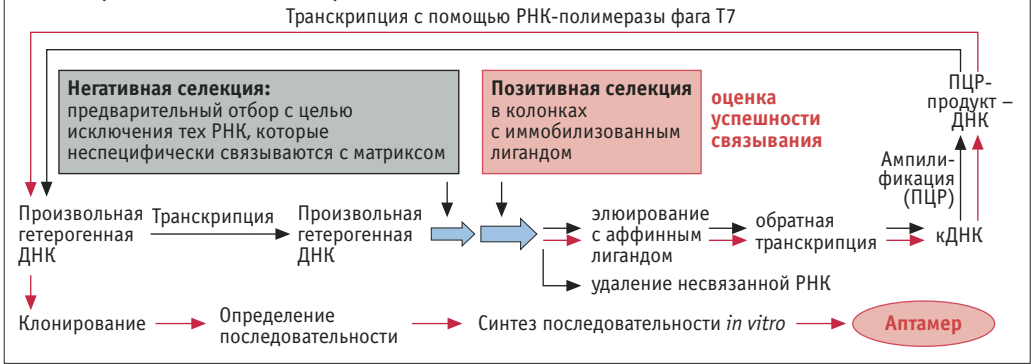
ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ СИНТЕЗ БЕЛКА. На матрице ДНК синтез белков возможен и в неклеточных условиях. Для этого требуется лизат *E. coli*, в котором содержатся РНК-полимераза, различные тРНК, рибосомы и аминокислоты. В присутствии АТФ удается получить до 1 мг белка за 24 часа. Этот метод коммерчески доступен (ProteoMaster™) и особенно подходит для таких белков, гиперпродукция которых вредна для клетки-хозяина (токсины, протеазы).

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ. Использование вирусных РНК-векторов в генной терапии описано в другом разделе. Фракция мРНК из клеток опухоли человека успешно используется для трансформации моноцитов пациента. Их получают из зрелых дендритных клеток *in vitro* уже содержащими специфичные для опухоли мРНК и используют для стимулирования специфичных к опухоли цитотоксичных Т-лимфоцитов.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩАЯ РНК (RNAI). Посттранскрипционный сайленсинг генов стал известен в последние годы как важный механизм регуляции экспрессии и формирования устойчивости к вредоносным эндо- и экзогенным РНК (например, к РНК-вирусам). Именно поэтому РНК-интерференцию называют «им-

мунной системой генома». В некоторых случаях РНК имеет вид рибозима (и следовательно обладает каталитической активностью) и способна к гидролизу фосфодиэфирных связей даже в отсутствие нуклеаз. В медицине разрабатывают рибозимы для клинической терапии вирусных инфекций (ВИЧ, гепатит В) и рака. Вероятно, во всех эукариотических клетках мРНК может быть разрушена посредством РНК-интерференции. В ходе этого процесса короткую двухцепочечную РНК (dsRNA) активирует РНКаза (DICER, т. е. «игрок в кости»), которая расщепляет dsRNA на небольшие фрагменты длиной 21–23 п.н. («руководящая» РНК). Затем в ходе так называемого эффективного этапа они участвуют в АТФ-зависимой активации РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC), в который входят хеликаза, эндо- и экзонуклеаза, обеспечивающие специфичную активность. У целевых мРНК имеется последовательность, комплементарная «руководящим» РНК в составе RISC-комплекса, поэтому эти мРНК могут связываться с RISC и подвергаться деградации нуклеазами. Предполагается, что находящаяся в интронах ДНК участвует в управлении механизмом, играющим решающую роль при регуляции экспрессии, т. е. определяет, какие гены экспрессируются в том или ином типе клеток. К потенциальным областям применения малых интерферирующих РНК можно отнести и терапию вирусных заболеваний. Путем экспрессии специально синтезированной искусственной двухцепочечной РНК под промотором гена РНК-полимеразы III может быть предотвращена экспрессия специфичных вирусных генов в трансформированных клетках.

SELEX (получение аптамеров)

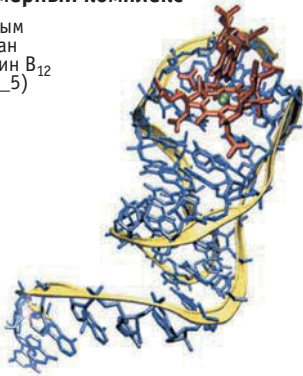


Аптамеры на основе РНК с высоким сродством к внеклеточным белкам (примеры)

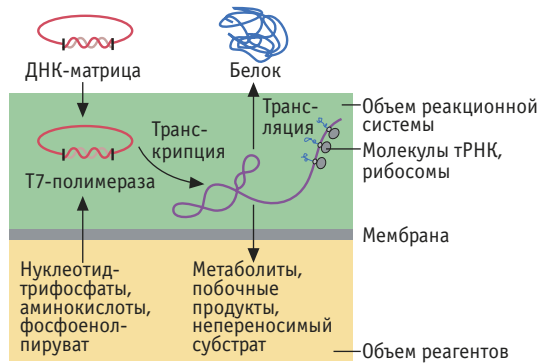
Целевой белок	K_d (нмоль)	Нуклеиновая кислота
Ацетилхолиновый рецептор	2,0	РНК
Основной фактор роста фибробластов (PGDF)	0,35	РНК
γ -Интерферон	6,8	2'-Модифицированная РНК
Фактор роста кератиноцитов (KGF)	0,0003	2'-Модифицированная РНК

Аптамерный комплекс

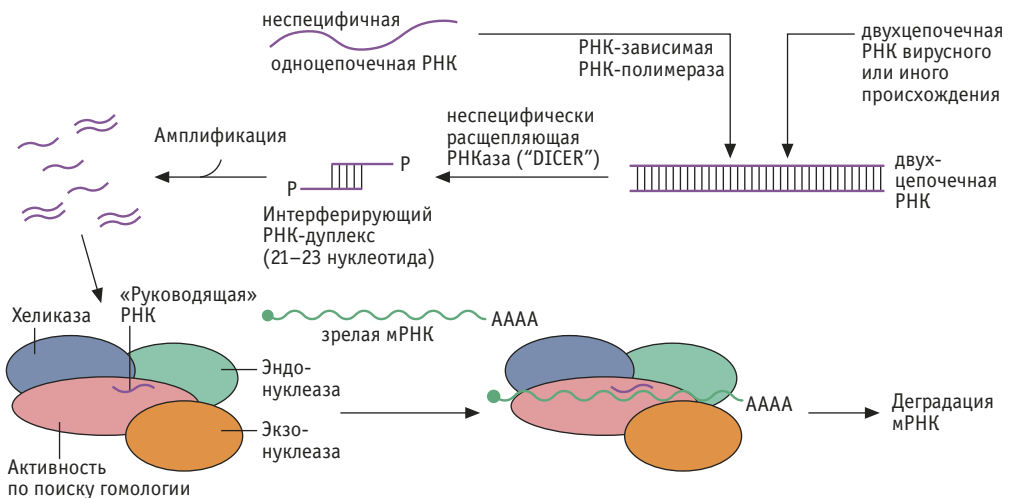
Красным показан витамин B₁₂ (1DDY_5)



Биосинтез белков *in vitro*



RNAi – интерферирующая РНК



Геномные библиотеки и картирование генома*

ВВЕДЕНИЕ. Даже такие небольшие геномы, как у фагов или вирусов, оказываются слишком велики для прямого секвенирования. Для изучения структуры генома его расщепляют на мелкие фрагменты, определяют нуклеотидную последовательность фрагментов путем секвенирования, а затем с помощью компьютерных методов создают полную ДНК- или РНК-карту генома. Генетический код избыточен, поэтому для изучения структуры генома (генетического картирования) необходимо иметь соответствующие маркерные участки (маркеры), как правило, это — ДНК-маркирующие сайты *STS* (*sequence-tagged sites*).

ГЕНОМНАЯ БИБЛИОТЕКА. Геномная библиотека — это множество клонированных фрагментов ДНК, в совокупности охватывающих весь геном. Для получения библиотеки геном расщепляют на фрагменты, а затем полученные фрагменты встраивают в векторы. Для облегчения процедуры упорядочивания фрагменты должны быть достаточно крупными, поэтому для ферментативного расщепления используют такие рестриктазы, сайты которых встречаются в геноме относительно редко. Примером может служить рестриктаза *NotI*, узнающая последовательность 5'-GCGGCGC-3'. Необходимо учитывать, что частота встречаемости той или иной последовательности в геноме зависит от GC-состава ДНК и от частоты повторяемости участков ДНК.

ВЕКТОРЫ. При создании геномной библиотеки фрагменты ДНК встраивают в векторы, а затем полученные ДНК-конструкции вводят в клетки. В таком виде фрагменты ДНК доступны для выделения, анализа и амплификации. Чем крупнее геном, тем большим количеством клонов представлена полная геномная библиотека. Для больших эукариотических геномов наиболее подходящими векторами являются космиды или дрожжевые/бактериальные искусственные хромосомы *YAC/BAC* (*yeast/bacterial artificial chromosomes*). В эти векторы можно встраивать фрагменты ДНК размером до 2 млн п.н., однако для прямого секвенирования такие фрагменты слишком велики. Субклонирование осуществляют, используя векторы на основе генома фага λ , например космиды, позволяющие встраивать фрагменты ДНК размером 30–45 т.п.н.

КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОМА. Классический метод картирования генома основан на наблюдении за наследованием сцепленных фенотипических признаков. Так, для представителей аскомицетов *Neurospora crassa* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* можно построить физическую карту генома, анализируя тетрады: у этих организмов споры в аске располагаются в том порядке, в котором они образовались при мейозе,

поэтому изучение распределения фенотипических признаков облегчается. Методы генетической инженерии значительно расширили возможности картирования генома. Результаты секвенирования фрагментов генома, полученных после ферментативного расщепления, позволяют определить полную структуру небольшого генома или выделить уникальные маркерные последовательности больших геномов. С помощью хорошо подобранных праймеров для ПЦР или зондов для гибридизации можно получать специфичные маркеры для больших фрагментов ДНК, например для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH — *fluorescence in situ hybridization*). «Причесывание» ДНК — способ упорядочивания ДНК для маркировки. Для этого в раствор, содержащий крупные фрагменты ДНК (около 10 т.п.н.), погружают обработанный полилизинем носитель. При медленном удалении носителя из раствора (со скоростью примерно 0,3 мм/с) ДНК-фрагменты располагаются на нем параллельно друг другу, что значительно облегчает процесс их маркировки. Для анализа больших эукариотических геномов ранее создавали хромосомно-специфичные библиотеки. Их сохраняют посредством окрашивания флуоресцентными красителями и клеточной сортировки, зависящей от интенсивности флуоресценции (FACS), так как количество красителя, связанного с отдельными хромосомами, меняется.

ДНК-МАРКИРУЮЩИЕ САЙТЫ (STS) — это специфические участки ДНК размером 100–500 п.н., которые встречаются в геноме всего один раз. Изначально предполагается, что *STS* не содержат повторяющихся последовательностей. *STS* часто получают из больших фрагментов генома, содержащихся в клонотеке (библиотеки *BAC* или *YAC*). Если при секвенировании генома удалось получить коллекцию таких ДНК-маркеров, то, создав на их основе праймеры для ПЦР, можно определить их взаиморасположение в геноме: размер продукта ПЦР зависит от расстояния между маркерами в геноме. В банке данных можно найти более крупные последовательности ДНК, несущие два соседних ДНК-маркера. ДНК-маркеры представляют собой очень удобный инструмент для анализа сцепленных генов.

Геномные библиотеки

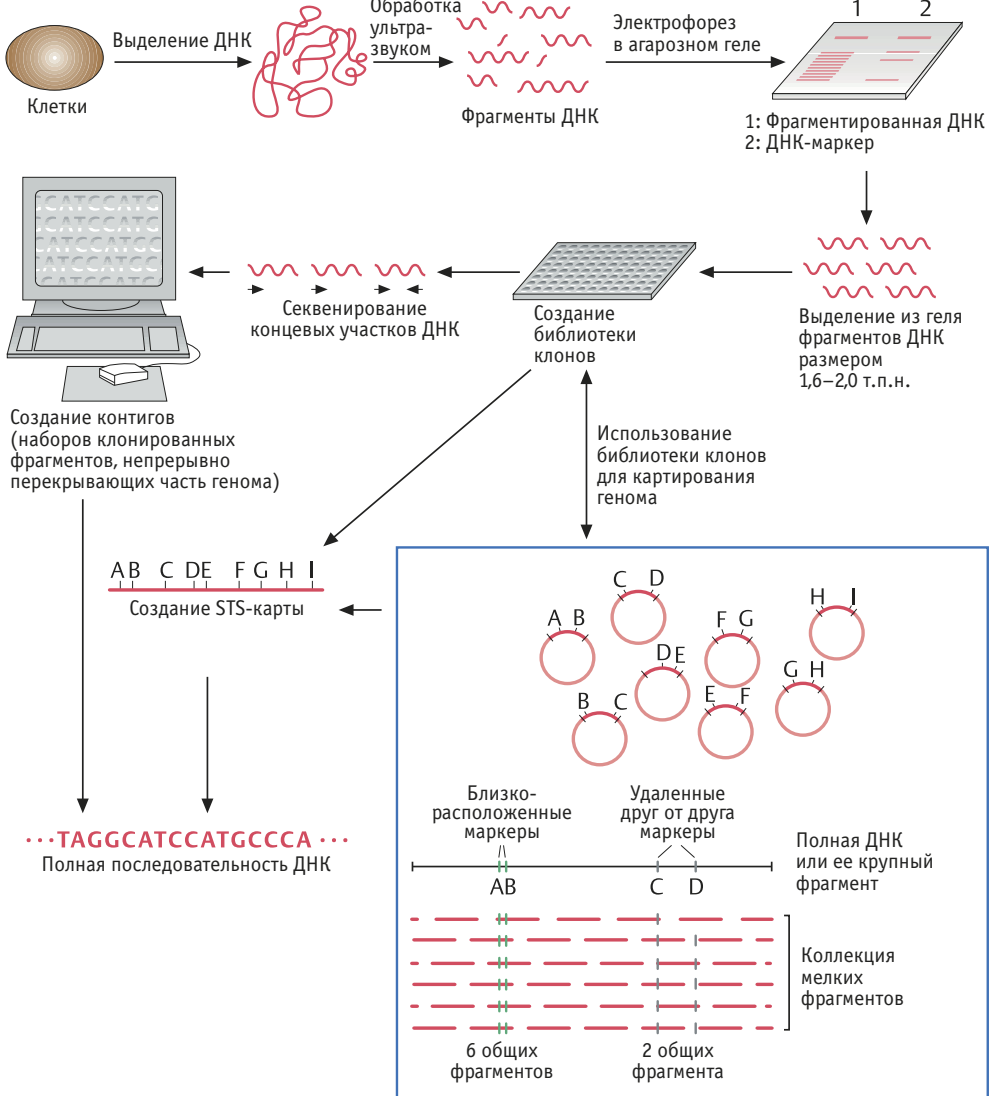
	Гаплоидный геном <i>b</i>	Число исследованных клонов (P = 95%)			YAC a = 1000 т.п.н.
		λ-Вектор (EMBL4) a = 17 т.п.н.	Космиды a = 35 т.п.н.	ВАС a = 250 т.п.н.	
<i>E. coli</i>	4 800 000	850	410	56	13
<i>S. cerevisiae</i>	14 000 000	2 500	1 200	167	41
<i>Drosophila melanogaster</i>	170 000 000	30 000	14 500	2 036	508
Томат	700 000 000	123 500	59 000	8 387	2 096
Человек	3 000 000 000	529 000	257 000	35 948	8 986
Лягушка	23 000 000 000	4 053 000	1 969 000	275 602	68 901

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-a/b)}$$

N = число исследованных клонов
P = вероятность

a = средняя длина ДНК-фрагментов, встроенных в вектор, п.н.
b = полный размер генома, п.н.

Картирование генома



Геном прокариот

ВВЕДЕНИЕ. При создании генетических карт прокариот анализируют изменения фенотипических признаков, происходящие в результате процессов конъюгации (перенос ДНК из одной контактирующей клетки в другую), трансдукции (передача ДНК между двумя бактериальными клетками с помощью фага) или трансформации (введение очищенной ДНК в клетку). Первая физическая карта генома (полная нуклеотидная последовательность) была получена в 1995 г. Для построения карты генома используют метод выстраивания клонированных фрагментов в контиги и метод «дробовика» (*shotgun*).

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КАРТЫ. За изменением многих фенотипических признаков можно наблюдать при размножении бактерий. В качестве маркеров можно использовать способность бактерии образовывать жгутики или споры, а также устойчивость к антибиотику. Для изучения путей биосинтеза используют мутантные штаммы, в которых блокирована одна из стадий биосинтеза. Для роста таких мутантов необходимо наличие в среде веществ, которые кодируют эти признаки. Таким образом, карты генома прокариот строят в масштабе минут или центисом. Процесс переноса всего генома *E. coli* в клетку-реципиент при 37 °С занимает 100 мин.

ФИЗИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ: ПОЛУЧЕНИЕ КОНТИГОВ. Важной задачей является идентификация клонов геномной библиотеки, содержащих перекрывающиеся фрагменты ДНК (контиги) (от *англ.* contiguous – непрерывный). Исходя из этой информации, можно реконструировать непрерывный ряд клонированных фрагментов, составляющих весь геном. Для поиска контигов применяют метод генетической «дактилоскопии» (*clone fingerprinting*), например, сравнивая рестриктные карты или перекрывающиеся STS и выявляя «соседние» клоны. Полезную информацию можно получать из анализа распределения генетических маркеров. Позиционное клонирование (т. е. поиск гена, соседствующего с маркером) осуществляют методом «прогулки по хромосоме» (*chromosome walking*). Уникальный участок ДНК, примыкающий к одному из концов клонированного фрагмента, используют в качестве зонда для гибридизации с геномной библиотекой. Некоторые гибридизующиеся клоны полностью перекрываются с исходным участком, а другие включают новые сег-

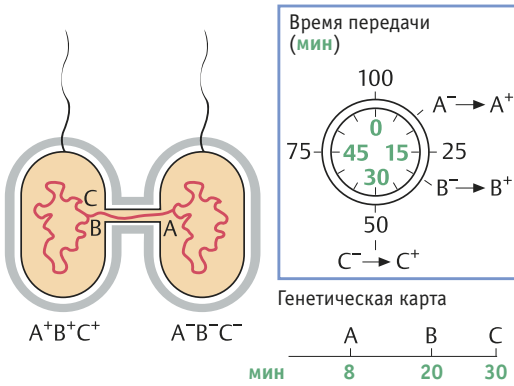
менты. Таким образом карта расширяется. При повторении этой процедуры совершается «прогулка» на большее расстояние.

ФИЗИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОМА: МЕТОД «ДРОБОВИКА» (*SHOTGUN*). Физическая карта генома представляет собой его полную нуклеотидную последовательность. В настоящее время возможно секвенирование фрагментов ДНК размером до 600 п.н. Для создания физической карты геном разрезают на небольшие фрагменты с помощью рестриктаз или ультразвука, затем секвенируют клонированные фрагменты и с помощью компьютерных программ устанавливают последовательность их расположения в геноме. Современные компьютерные технологии позволяют быстро составлять карты и анализировать бактериальные геномы (размером, как правило, до 5 млн п.н.). Наличие генетических карт и постоянное пополнение данных о взаиморасположении генетических маркеров позволяет проводить корреляцию между физической и генетической картами. Так, к 1990 г. на хромосоме *E. coli* были локализованы более 1400 генетических маркеров, расположенных в среднем через каждые 3300 п.н. (размер всего генома *E. coli* составляет 4,64 млн п.н.).

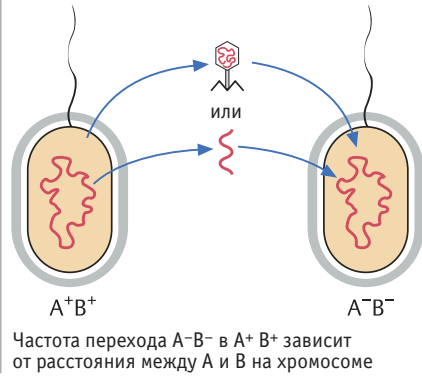
БИОИНФОРМАТИКА. Большинство компьютерных программ для анализа генома основываются на поиске гомологичных последовательностей, поэтому даже такое редкое явление, как ошибка секвенирования (стандартная точность секвенирования составляет 99%), приводит к появлению неточностей практически во всех последовательностях. По этой причине в компьютерные банки данных вносят информацию, подтвержденную многократным секвенированием.

Генетическая карта, составленная по результатам скрещивания

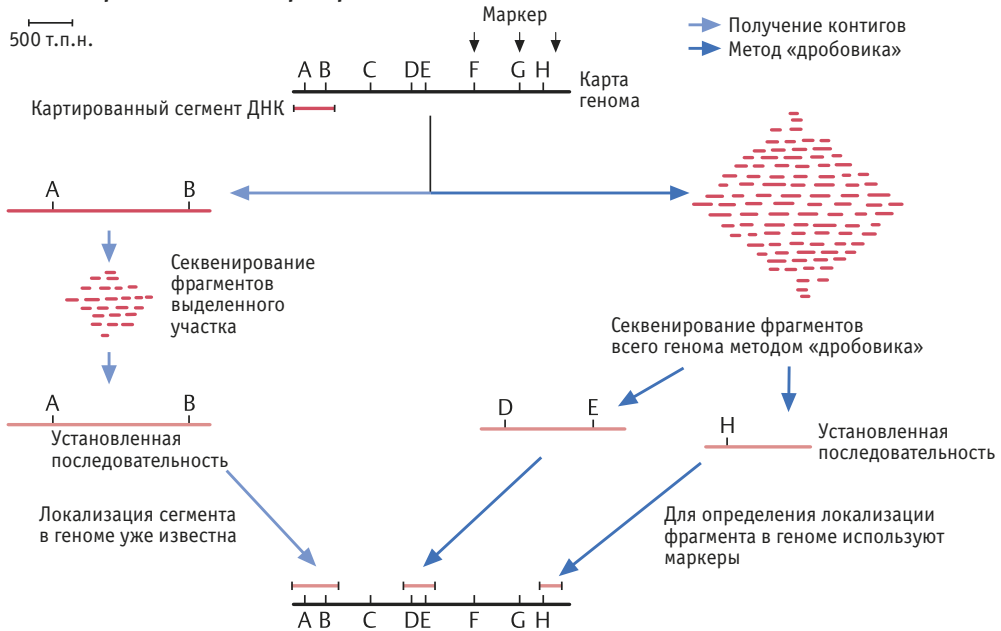
Последовательная передача маркерных генов А, В и С в процессе конъюгации



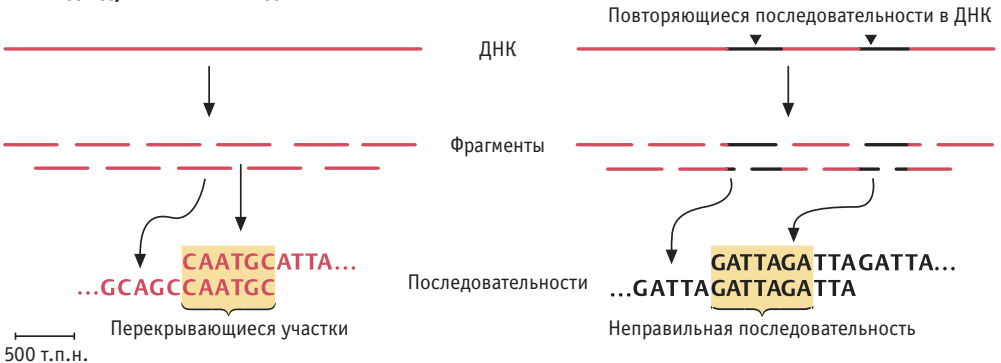
Перенос соседствующих маркерных генов А и В в процессе трансдукции или трансформации



Секвенирование генома прокариот



Метод «дробовика»: недостатки



Геном эукариот

ВВЕДЕНИЕ. Карты геномов эукариот получают так же, как и карты геномов прокариот, путем анализа сцепленного наследования генетических маркеров. Клетки эукариот содержат диплоидный или полиплоидный набор хромосом, поэтому проявления одного и того же фенотипического признака может соответствовать различным генотипам (гомозигота или гетерозигота). При размножении в процессе мейоза происходит естественная рекомбинация, в результате которой генетический материал (а, следовательно, и фенотипические признаки) перераспределяется в клетках потомства. Закономерности этого процесса впервые были описаны Грегором Менделем. Из-за большого размера физическое картирование эукариотического генома — более сложная задача, чем секвенирование генома прокариот. Кроме того, эукариотическая ДНК содержит интроны и повторяющиеся последовательности. Тем не менее, несмотря на все сложности, к настоящему времени созданы физические карты геномов многих эукариотических организмов, среди которых дрожжи, нематода, плодовая мушка, человек, мышь, крыса, рис, а для некоторых других организмов секвенирование находится в заключительной стадии.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ. Генетическое картирование основывается на изучении наследования фенотипических признаков при кроссинговере (*crossing-over*) в процессе мейоза. Если два гена, отвечающие за различные фенотипические признаки, находятся рядом на хромосоме, они наследуются вместе чаще, чем удаленные друг от друга гены. На основании наблюдений о частоте рекомбинации признаков можно построить генетическую карту, на которой расстояние между генами выражается в процентах вероятности рекомбинации. Такой классический подход в последнее время дополняют методами молекулярной генетики: по результатам рестрикционного анализа проводят так называемую «геномную дактилоскопию»; использование меченных флуоресцентной меткой праймеров позволяет идентифицировать крупные фрагменты ДНК или целые хромосомы (FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*).

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА. Точная локализация гена в геноме высших эукариот значительно затруднена из-за наличия многочисленных повторяющихся участков ДНК (сателлитная ДНК, Alu-повторы, ретротранспозоны). Так, в геноме млекопитающих на долю сателлитных ДНК приходится около 5% всей ДНК, около 20% генома представлены короткими инвертированными концевыми повторами SINE (*short interspersed repetitive elements*) длиной 100–500 п.н., в том числе Alu-повторами, а длинные инвертированные концевые повторы LINE (*long interspersed repetitive elements*) размером 6000–7000 п.н. составляют

до 10% генома. Кроме указанных повторяющихся ДНК, в геноме также присутствуют мини- и микросателлитные ДНК. Микросателлитные ДНК представляют собой повторяющиеся очень короткие последовательности, например AC или ACCC, встречающиеся в виде 10–50 копий. Такие микросателлитные ДНК распределены по всему геному, в геноме человека их более 10 000 копий. Каждый индивидуальный организм характеризуется своим специфическим расположением и количеством микросателлитных ДНК, поэтому их можно использовать в качестве генетических маркеров при выведении новых пород скота или при проведении судебной экспертизы. Большое количество повторов ДНК не позволяет использовать для исследования геномов эукариот метод «дробовика» (*shotgun*), успешно применяемый для картирования прокариотических геномов. Идентификацию и секвенирование перекрывающихся клонов проводят по результатам рестрикционного анализа, «прогулки по хромосоме» или после установления ДНК-маркирующих сайтов (STS) в обширных геномных библиотеках. Широко применяются так называемые экспрессирующиеся ДНК-маркеры (EST — *expressed tagged sites*), обнаруженные в результате анализа мРНК после завершения сплайсинга. Такая зрелая мРНК, как правило, не содержит повторяющихся участков, поэтому EST встречаются в геноме лишь 1 раз. При гибридизации праймеров, созданных на основании анализа EST, с ДНК геномной библиотеки удается идентифицировать те клоны, которые содержат фрагменты исследуемого гена. После обнаружения в библиотеке генов нужного клона необходимо установить положение фрагмента ДНК на физической карте генома, а также определить на нем места расположения маркеров, например сайтов расщепления рестриктазой или других специфических нуклеотидных последовательностей. Размер фрагмента, клонированного в составе космидного вектора или искусственной дрожжевой или бактериальной хромосомы, слишком велик для непосредственного секвенирования, поэтому следующим этапом является создание библиотеки на основе генома фага λ , содержащей данный участок ДНК. Компьютерный анализ перекрывающихся участков позволяет построить континги, а затем установить полную нуклеотидную последовательность ДНК хромосомы или всего генома. Одним из важных критериев достоверности полученной физической карты является ее соответствие генетической карте.

Генетические карты

Гены

m короткие крылья



v красные глаза



w белые глаза



y желтое тело



Взаимное расположение генов

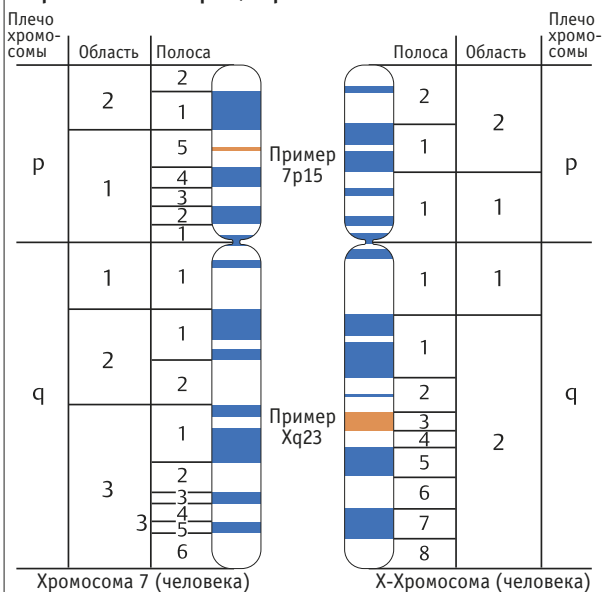
y	w	v	m
0	1,3	30,7	33,7

Частота рекомбинации:

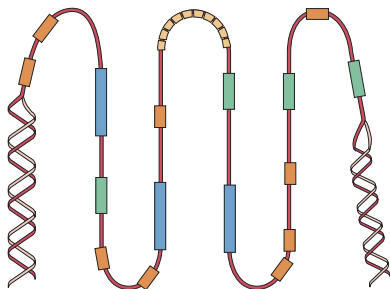
между m и v	3,0%
между m и y	33,7%
между v и w	29,4%
между w и y	1,3%

Описание структуры хромосом:

хромосома в метафазе, окрашивание по Гимзе



Организация эукариотического гена



Сателлитная ДНК:
теломерные и центромерные области,
минисателлиты (16–64 п.н.),
микросателлиты (2–4 п.н., до 50 копий)

■ SINE – короткие инвертированные повторы, 100–500 п.н.

■ LINE – длинные инвертированные повторы, до 7000 п.н.

■ Ген

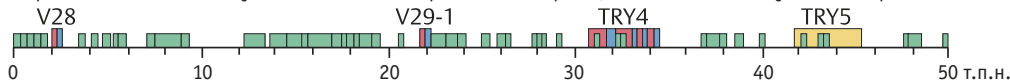
■ Центромера

Теломера (5'-TTAGGG-3')

Структура геномов различных организмов

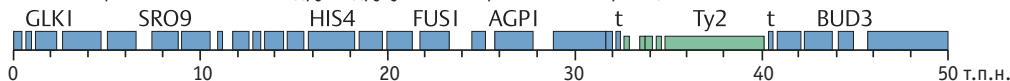
а Человек:

расположенные вплотную экзоны, много интронов и повторяющихся элементов, отсутствие оперонов



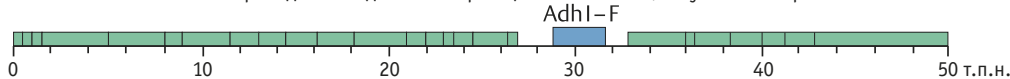
б Дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*):

экзоны расположены близко друг к другу, мало интронов и повторяющихся элементов



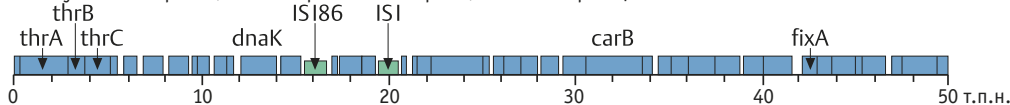
в Кукуруза (*Zea mays*):

большая часть генома приходится на долю повторяющихся элементов, отсутствие оперонов



г Бактерии (*Escherichia coli*):

отсутствие интронов, часто встречаются опероны, мало повторяющихся элементов



■ Ген ■ Интрон ■ Псевдоген ■ Повторяющиеся элементы

t = РНК-ген

Геном человека

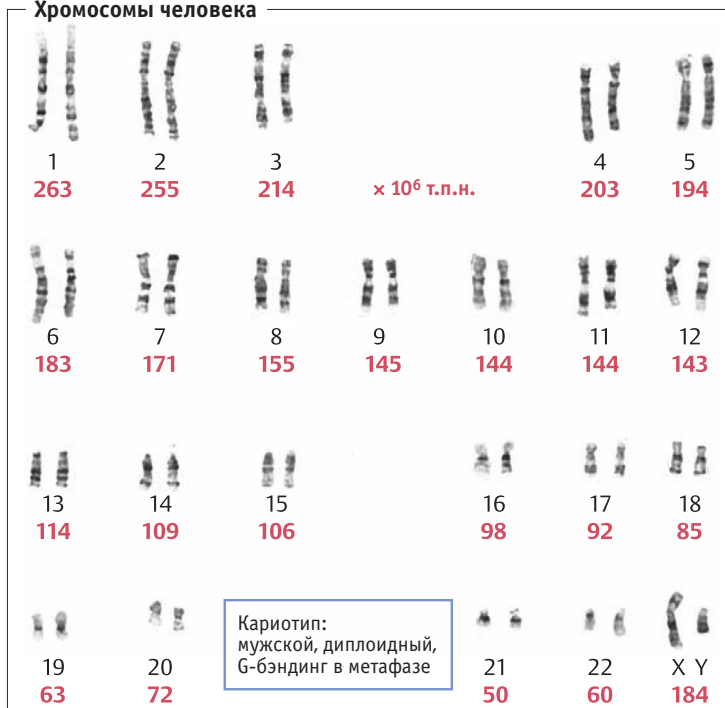
ВВЕДЕНИЕ. При изучении генома человека исследователи ограничены в экспериментальных данных, так как генетические испытания на человеке недопустимы. В то же время в результате демографического взрыва в современном обществе (по сравнению с доисторической эпохой и последующим периодом) в настоящее время население Земли составляет 6% всех людей, когда-либо живших на нашей планете. Современная популяция предоставляет ученым разнообразный генетический материал. Анализ ДНК членов больших семей, проводимый в течение нескольких десятилетий, позволил построить карты хромосом и локализовать на них гены, отвечающие за сотни различных наследственных заболеваний. Однако установление четких генетических маркеров для человека остается очень трудной задачей. Геном человека имеет размер около 3 млрд п.н., ДНК распределена между 23 хромосомами. Лишь несколько процентов геномной ДНК содержит последовательности, необходимые для синтеза белков. Значительная часть генома представлена тандемными повторами, функция которых до сих пор не установлена.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ. В качестве фенотипических признаков в генетике человека служат наследственные заболевания. В результате анализа ДНК больших семей, анализа хромосом, а также функционального и позиционного клонирования удалось локализовать гены, изменения в которых приводят к тем или иным наследственным заболеваниям. В Центре изучения полиморфизма человека, основанном в 1984 г. в Париже, собрана обширная коллекция клеточных линий членов более 100 семей. В среднем каждая семья представлена клетками четырех прародителей, двух родителей и восьми детей. В последнее время активно изучается генетика частично изолированных популяций (население Исландии, Тасмании). Для таких популяций возможно функциональное картирование генома в результате анализа генетического полиморфизма и наследуемых фенотипических признаков. В качестве генетического маркера, как правило, используют микросателлитные ДНК: с одной стороны, они встречаются в геноме достаточно часто и распределены по геному равномерно; с другой стороны, последовательность микросателлитной ДНК настолько вариабельна, что вероятность гетерозиготности индивидуума по микросателлитной ДНК составляет около 70%. Вариабельность микросателлитной ДНК позволяет различать генные локусы, сцепленные с этой ДНК. В 1994 г. в результате анализа 291 мейоза (304 человека из 20 семей из базы Центра изучения полиморфизма человека) удалось локализовать 2335 микросателлитных ДНК и таким образом составить генетическую карту, несущую маркер через каждые 600 т.п.н. К настоящему времени разрешение

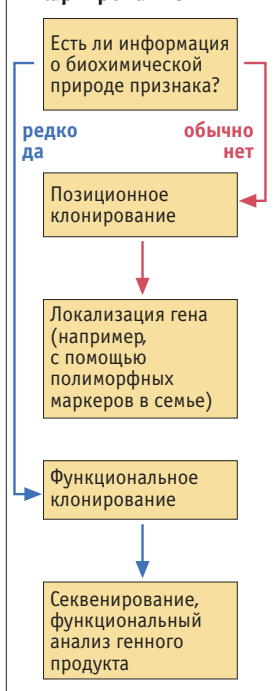
этой карты уже достигло 100 т.п.н.

АНАЛИЗ ГЕНОМА. С 1990 г. началась реализация международного проекта, целью которого стало определение нуклеотидной последовательности всего генома человека. Из обширной геномной библиотеки (около 300 000 ВАС-клонов), содержащей клоны с ДНК различных хромосом, методами рестриктоного анализа, «прогулки по хромосоме» и STS-идентификации удалось отобрать клоны, содержащие участки ДНК, расположенные рядом на хромосоме. Такие участки были секвенированы (секвенирование проводили несколько раз и в разных направлениях, чтобы уменьшить вероятность ошибки), и полученные данные были внесены в компьютер, где подлинность результатов секвенирования была еще раз подтверждена их совпадением с результатами генетического картирования. С 1996 г. началась работа по секвенированию более 50 000 EST-экспрессирующихся ДНК-маркеров. В 1998 г. частная исследовательская фирма Celera предложила альтернативный метод создания физической карты генома человека с использованием стратегии «дробовика» (shotgun). Согласно этой методике, ДНК человека разрезали на 60 млн фрагментов длиной около 2000 п.н. или на 10 млн фрагментов длиной около 10 000 п.н. Затем для каждого фрагмента секвенировали концевые участки по 500 п.н. В ДНК человека встречаются тандемные повторы длиной до 5 т.п.н., поэтому секвенирование концевых участков крупных фрагментов (10 000 п.н.) должно было гарантировать правильное взаиморасположение таких повторов на создаваемой карте генома. В настоящее время показано, что даже при использовании такого подхода возможны ошибки. Полная длина секвенированной ДНК в этом случае составила 35 млрд п.н., что соответствует 12-кратной избыточности. Оба проекта были завершены, и в начале 2001 г. была опубликована полная последовательность генома человека. Неожиданным оказался тот факт, что на всей ДНК человека удалось идентифицировать лишь 30 тысяч генов. Современные исследования направлены на секвенирование тех областей, в которых были обнаружены неточности, а также на установление полного соответствия между физической и генетической картами генома человека. Современные исследования сфокусированы на понимании отличий, специфичных для различных клеточных типов при трансляции определенного гена (протеомика), а также на понимании индивидуальных генетических различий («снисов», или *англ.* SNP, т. е. полиморфизм одиночных нуклеотидов) у здоровых и больных индивидов.

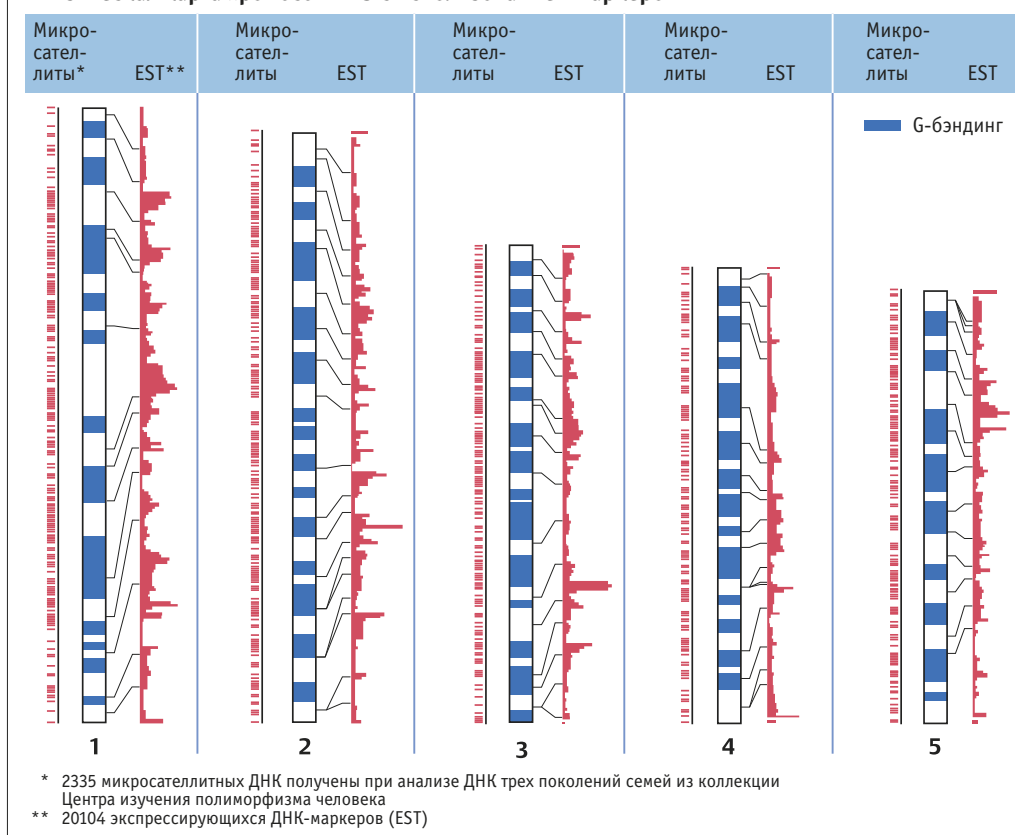
Хромосомы человека



Картирование



Физическая карта хромосом 1–5 с использованием маркеров



Функциональный анализ генома человека

ВВЕДЕНИЕ. Целью функционального анализа генома человека в первую очередь является установление генетических механизмов моногенных или полигенных наследственных заболеваний. Для этого необходимо идентифицировать гены, отвечающие за формирование фенотипического признака, а затем установить, какие изменения в нуклеотидной последовательности приводят к измененному фенотипу, соответствующему симптомам заболевания. Некоторые наследственные заболевания обусловлены заменой лишь одного нуклеотида (*полиморфизм одного нуклеотида*, или сокращенно *снипса*, SNP), например муковисцидоз. Данные функционального анализа генома человека необходимы для: 1) генетического исследования тех участков генома, которые могут быть причислены к «областям риска»; 2) разработки новых терапевтических препаратов с новыми «мишенями»; 3) индивидуального подхода к лечению заболевания с учетом генетических причин патологии; 4) генной терапии; 5) изучения молекулярной физиологии и патофизиологии человека (см. также раздел «Протеомика», стр. 272

ДИАГНОСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. В составе двойного хромосомного набора каждый индивидуум обладает примерно 6 млн снипсов (SNP) (в среднем 1 на 1000 п.н. ДНК). В рамках международного проекта *НарМар* к середине 2005 г. в научных базах данных должно оказаться около 1 млн снипсов (SNP) индивидов европейского, китайского, японского и нигерийского происхождения. Если снипс (SNP) находится внутри сайта узнавания некоторой рестриктазы, фермент перестает узнавать этот сайт, однако по-прежнему расщепляет интактную ДНК в другой хромосоме. Таким образом, данные рестриктового анализа отличаются у двух аллелей одного гена, т. е. наблюдается *полиморфизм длины рестрикционных фрагментов* (ПДРФ). Большинство снипсов (SNP) не приводят к фенотипическим проявлениям. Установление их связи с моногенными (некоторые заболевания крови, брахидактилия) или полигенными (цвет волос, интеллект, предрасположенность к онкологическим заболеваниям) фенотипическими признаками — очень сложная задача. Для ее решения требуется применение самых разнообразных методов, прежде всего — анализа сцепленных признаков. Важная информация может быть получена при сравнении генома человека с геномами других организмов. Даже такие филогенетически отдаленные организмы, как плодовая мушка, нематода или дрожжи (*Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Saccharomyces*), обладают множеством генов, функционально и структурно сходных с генами человека. В исследовательских целях гены этих организмов можно подвергнуть определенным изменениям (что невозможно делать с генами

человека) и таким образом изучать механизм их действия. В этой связи особое место занимает анализ генома мыши. Нуклеотидная последовательность генома мыши (3,3 млрд п.н.) полностью расшифрована; показано, что геном мыши обладает большим генетическим и физиологическим сходством с геномом человека. Линии «нокаутных» мышей, у которых направленно выключены определенные гены или регуляторные элементы, служат моделью некоторых заболеваний человека (например, линия мышей с болезнью Альцгеймера, мыши линии SCID с тяжелым комбинированным иммунодефицитом). Изучение таких моделей занимает центральное место в фундаментальных и медицинских исследованиях. Результаты этих исследований открывают новые перспективы для диагностики генетических заболеваний, например с помощью ДНК-чипов: по результатам секвенирования определенных областей генома можно предсказать, болен ли пациент в настоящее время и насколько велик риск развития патологии в будущем. Конечно, при обсуждении возможностей применения таких подходов обязательно затрагивается этический аспект проблемы.

МИШЕНИ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ. Если установлено, что причиной наследственного заболевания является изменение определенного белка или его сигнальной последовательности, этот белок или белковый комплекс, полученный в рекомбинантной форме, становится мишенью при скрининге новых лекарственных препаратов. Однако регуляция обмена веществ и фармакодинамика в организме (его усвояемость, распределение, метаболизм в организме и др.) — все это очень усложняет проблему, а изучение действия препарата на рекомбинантные белки — всего лишь начальная стадия пути к лекарственному препарату.

ФАРМАКОГЕНОМИКА. Целью фармакогеномики является установление индивидуальных различий при полигенных заболеваниях (т. е. поиск мишени для терапии в каждом конкретном случае), изучение особенностей метаболизма лекарств у пациента и разработка индивидуальной стратегии лечения. Предполагается, что полученные таким способом данные в будущем смогут помочь при выборе наиболее эффективного лекарства, а также снизить риск возникновения нежелательных побочных явлений.

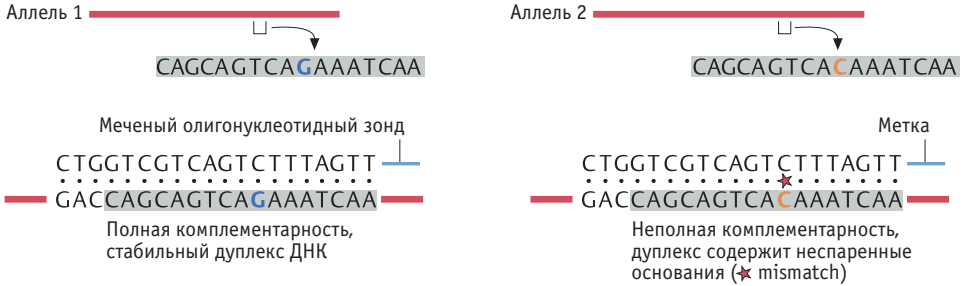
ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ. Детальный анализ структуры и функций генома человека позволяет использовать методы генетической инженерии в генной терапии, например заменять дефектный ген на его полноценную копию.

Полиморфизм и снипсы (SNP)

Случай 1 Полиморфизм в сайте узнавания рестриктазы



Случай 2 Полиморфизм одного нуклеотида – SNP

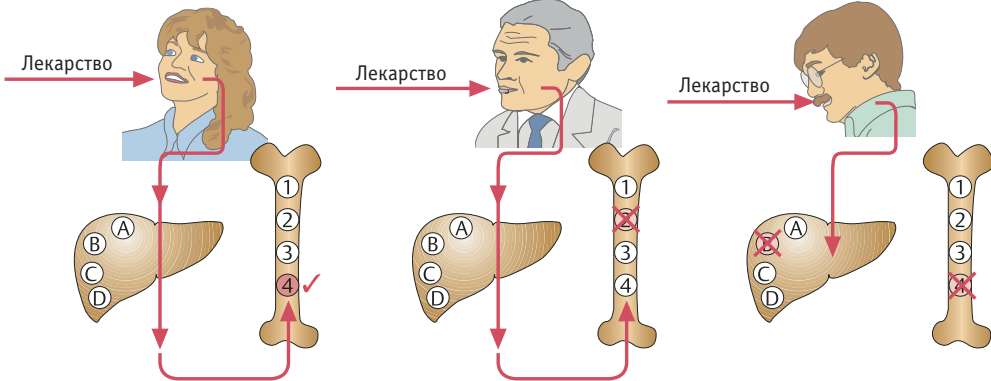


Фармакогеномика

Пациент А: лекарство оказывает положительное действие

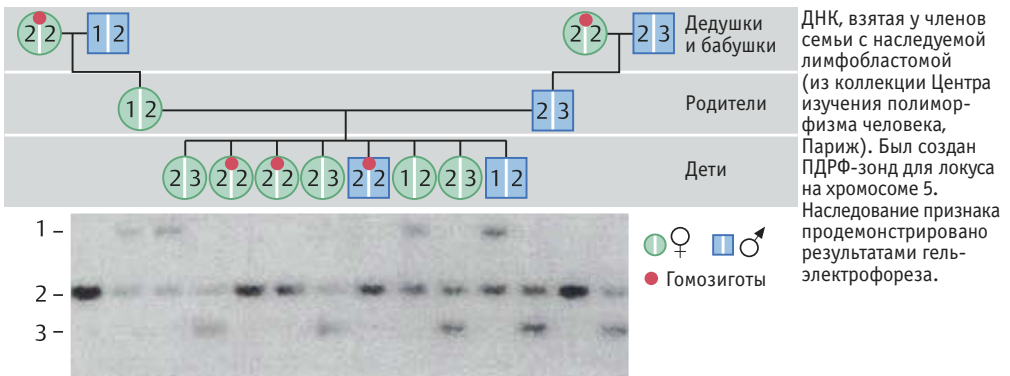
Пациент В: лекарство не оказывает никакого действия

Пациент С: лекарство не оказывает никакого действия



(A)–(D) Этапы обмена веществ, при которых происходит активация лекарства
 (1)–(4) Этапы обмена веществ, нарушенные при заболевании

Наследование ПДРФ (полиморфизм длины рестриктных фрагментов)



ДНК-анализ

ВВЕДЕНИЕ. При гибридизации нуклеиновых кислот (ДНК–ДНК, ДНК–РНК, РНК–РНК) происходит образование водородных связей между комплементарными основаниями. Для визуализации результатов гибридизации нуклеотидная цепь должна содержать радиоактивную, флуоресцентную, хемилюминесцентную или другую метку. Исследуемый фрагмент ДНК амплифицируют методом ПЦР и анализируют полученную последовательность с целью подбора праймеров и условий гибридизации с тем, чтобы снизить вероятность ложноположительного или ложноотрицательного результата. Важным этапом является подготовка проб для гибридизации – выделение ДНК и РНК из биологического материала (моча, кровь, ткани животного, растения или ископаемых остатков). ДНК-анализы широко используются при идентификации патогенных организмов, диагностики наследственных заболеваний, в тестах сельскохозяйственных ГМО-продуктов, при установлении отцовства, в криминалистике и судебной медицине. Объем рынка продуктов для ДНК-тестирования в мире с 2000 по 2004 г. вырос с 1 до более 7 млрд долл. США, а использование в будущем ДНК-чипов, вероятно, еще увеличит этот показатель.

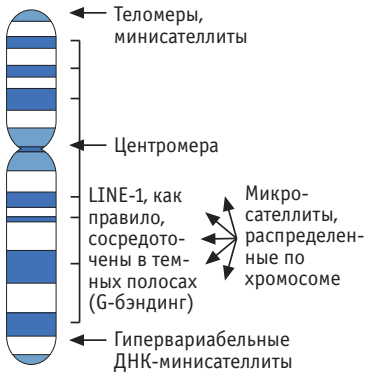
ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА. В стандартных методиках ДНК-анализа применяют следующие инструментальные методы: 1) различные методы электрофореза; 2) метод гибридизации с использованием меченых зондов; 3) ДНК-чипы. Методом электрофореза определяют молекулярную массу фрагментов ДНК (путем сравнения с набором фрагментов известной длины). В методике гибридизации в цепь ДНК интеркалируется репортерная группа, например пара биотин–авидин или биотин–стрептавидин. С использованием методики LightCycler™ оценивают в реальном времени содержание амплифицированной ДНК с флуоресцентной меткой (SYBR Green™). В системе TaqMan™ используется короткоцепочечный ДНК-зонд с флуорофором и гасителем флуоресценции на гибридизируемых концах. Если в гибридизованном образце есть способная к гибридизации последовательность, происходит связывание зонда и активация флуорофора.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ. Методы геномной дактилоскопии (ДНК-генотипирование) применяются прежде всего в судебной медицине и при установлении отцовства. Для установления личности преступника проводят сравнение геномной ДНК, полученной из биологического материала с места преступления, с ДНК подозреваемого. При этом особое внимание уделяют расположению фрагментов ДНК с tandemно повторяющимися идентичными мотивами – микросателлитной изменчивостью (метод геномной «дактило-

скопии»). Вероятность того, что у двух индивидуумов участки микросателлитной ДНК расположены одинаковым образом, очень мала (исключение – однояйцевые близнецы). Анализ снипсов (SNP) пациента является важной диагностической процедурой, направленной на установление индивидуальной переносимости и фармакологического действия лекарственных препаратов (методы фармакогеномики). В рамках проекта ХарМар Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) к середине 2005 г. планировалось внести в базу данных информацию о примерно 4,5 млн снипсов (SNP) человека. Требуется около года для того, чтобы определить генотип человека по множеству снипсов (SNP) и точный фенотип (например, медикаментозную непереносимость). В селекции животных и растений анализ снипсов применяется для определения родства. С помощью генотипирования возможно с высокой точностью подтвердить состав сырья из трансгенных растений, а также определить наличие патогенных микроорганизмов в продуктах питания, крови или моче. Достаточно 1 мкл крови, чтобы определить наличие в ней возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*. Протоколы процедуры генотипирования и правила амплификации целевых фрагментов ДНК требуют знания последовательности искомым фрагментов для использования подходящей ДНК-матрицы.

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ. В настоящее время возможно выявление многих моногенных заболеваний плода уже на сроках беременности от 9 до 12 недель. В качестве источника ДНК используют образец эмбриональных клеток, которые отбирают через катетер из ворсинчатого хориона зародышевой оболочки плода. Техническая сторона этого метода анализа с целью оценки риска возникновения полигенных заболеваний в системе *in vitro* уже разработана (преимплантационная диагностика), однако вокруг этого вопроса сейчас развернута активная дискуссия, касающаяся этических аспектов.

ДНК-анализ в криминалистике

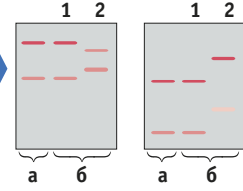


Гибридизация ДНК нескольких генных локусов



ДНК-дактилоскопия в криминалистике: изучение результатов саузерн-блота или ПЦР гипервариабельных микросателлитов из нескольких генных локусов или нескольких проб из одного генного локуса

2 зонда для одного генного локуса



а Проба ДНК, взятая на месте преступления
б Пробы ДНК двух подозреваемых

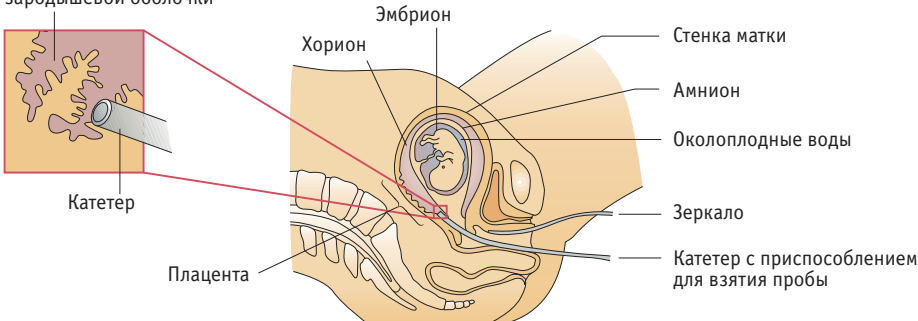
Микросателлитные последовательности	< 1 т.п.н.	(AC) _n -повторы, n = 10–50
Минисателлитные последовательности	1–30 т.п.н.	Многократно повторяющиеся последовательности, различное количество tandemных повторов (VNTR), субтеломера
Макросателлитные последовательности	< 1000 т.п.н.	В основном в теломерной последовательности и центромере; богата АТ
Инvertированные повторяющиеся последовательности	SINE: 100–500 п.н. LINE: 6–7 т.п.н.	Составляют до 20% генома человека, из них на долю Alu-повторов приходится до 5% генома Составляют до 10% генома человека

Примеры ДНК-диагностики инфекционных заболеваний

- Папилломавирус человека
- ВИЧ
- *Helicobacter pylori*
- Вирусы герпеса, в частности цитомегаловирус
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Neisseria meningitidis*
- *Borrelia burgdorferi*

Пренатальная диагностика

Ворсинчатый хорион зародышевой оболочки



ДНК-анализ ворсинчатого хориона зародыша (9–12 недель беременности)

Методы анализа:

Выявление хромосомных аномалий, биохимические тесты, метод FISH, ДНК-тестирование

ДНК-тестирование с целью выявления моногенных заболеваний плода

Заболевание (частота встречаемости)	Ген (расположение)
Серповидно-клеточная анемия (1:500, чернокожее население)	(11 укорочена)
Муковисцидоз (1:2500)	CFTR (7q31)
Гемофилия А и В (1:25000)	(Xq27)
Болезнь Хантингтона (1:20000)	IT15(4p 16.3)
Фенилкетонурия (1:10000)	PAH (12 удлинена)
Наследственный рак молочной железы (1:200, женщины)	BRCA1 (17q21)

Белковые и ДНК-чипы

ВВЕДЕНИЕ. ДНК-чипы (ДНК-зонды) позволяют одновременно анализировать результаты гибридизации большого числа проб. ДНК-чипы используются в следующих целях: 1) исследование процесса регуляции генов в различных типах клеток (*функциональная генетика*); 2) секвенирование ДНК; 3) быстрое определение полиморфизмов. В настоящее время существуют коммерческие «генные фильтры» из нейлона или нитроцеллюлозы, на которые нанесена кДНК фрагментов генома дрожжей, мыши, человека или других организмов. Плотность таких фильтров — около 100 олигонуклеотидов/см². Значительно более высокую плотность — несколько тысяч или сотен тысяч нуклеотидов на 1 см² — имеют фильтры с гладкой поверхностью (стекло или пластик). Разработаны два метода создания таких микрочипов: 1) последовательный фотолитографический синтез олигонуклеотидов на носителе; 2) микродепозиция — нанесение ДНК, кДНК или олигонуклеотидов с помощью так называемого «споттера». Использование меченых ДНК и окрашенных микробусин представляется в будущем перспективным, так как это позволит повысить правильность получаемых результатов благодаря возможности проводить параллельные ДНК-анализы с несколькими пробами.

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ МИКРОЧИПЫ. Метод основан на светозависимой реакции удаления защитных фотолabileльных групп фосфорамидитов с последующим взаимодействием между образовавшимися нуклеотидами. Технология фотолитографического «шаблона», используемая при контроле синтеза на носителе, позволяет получать микрочипы с плотностью до 250 000 олигонуклеотидов/см². На плате диаметром 20 см может быть иммобилизовано 60 млн ДНК-зондов. Максимальная длина олигонуклеотидов составляет 25 п.н. Создание фотолитографических «шаблонов» определенного прототипа чипов — очень дорогостоящая операция.

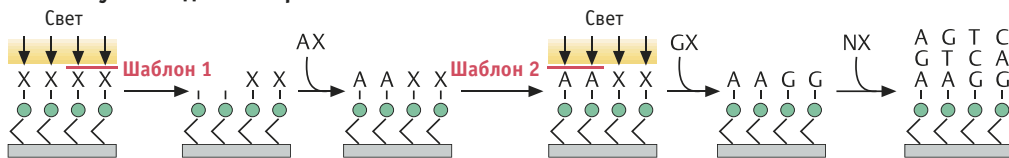
«МИКРОДЕПОЗИЦИЯ». Вместо того чтобы синтезировать ДНК *in situ*, можно наносить синтетические олигонуклеотиды, фрагменты одноцепочной ДНК или кДНК на искусственные поверхности, например стекло. Для связывания с носителем существуют стандартные методики, основанные на химических реакциях, протекающих на поверхности. Нуклеотидную цепь можно наносить на поверхность микроиглой или «выстрелом» микрокаплями (принцип струйного принтера). При применении коммерческих микроспоттеров скорость нанесения увеличивается и составляет более 10 000 фрагментов ДНК или кДНК в час. Они позволяют достичь плотности нанесения 10 000 олигонуклеотидов/см². Чипы используются для генотипирования, при анализе экспрессии, а также при определении снипсов (SNP) путем ресеквенирования

ДНК. Для этого чип должен содержать полную последовательность одной цепи анализируемой ДНК в виде перекрывающихся фрагментов. К примеру, используя чип из 16 000 20-членных олигонуклеотидов в эксперименте по гибридизации, можно идентифицировать 179 из 180 известных полиморфных сайтов митохондриальной ДНК (мтДНК) человека.

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ. Определение того, что произошла гибридизация, осуществляется, как правило, с использованием флуоресцентных красителей (красный «Су3», зеленый «Су5»), которые (как репортерные группы ковалентно связаны с dCTP) при ПЦР встраиваются в одноцепочечный ДНК-зонд. Детектирование происходит путем определения интенсивности флуоресценции лазерным сканером или ПЗС-матрицей (прибор с зарядовой связью). Другой метод детектирования основан на встраивании биотинилированных нуклеотидов; эта метка реагирует с авидином, «маркированным» золотом. Золотая метка может затем реагировать с коллоидным серебром, что приводит к 50-кратному усилению сигнала. В этом случае детектирование проводят наиболее простым методом, измеряя оптическое поглощение. Масс-спектрометрические методы (MALDI-TOF) позволяют провести быстрый полуквантитативный анализ гибридизации без использования маркерных молекул.

БЕЛКОВЫЕ МИКРОЧИПЫ. Вместо ДНК на микрочипы можно наносить изучаемые белки. В настоящее время ведутся попытки использовать рекомбинантные антитела или аптамеры при анализе протеомов.

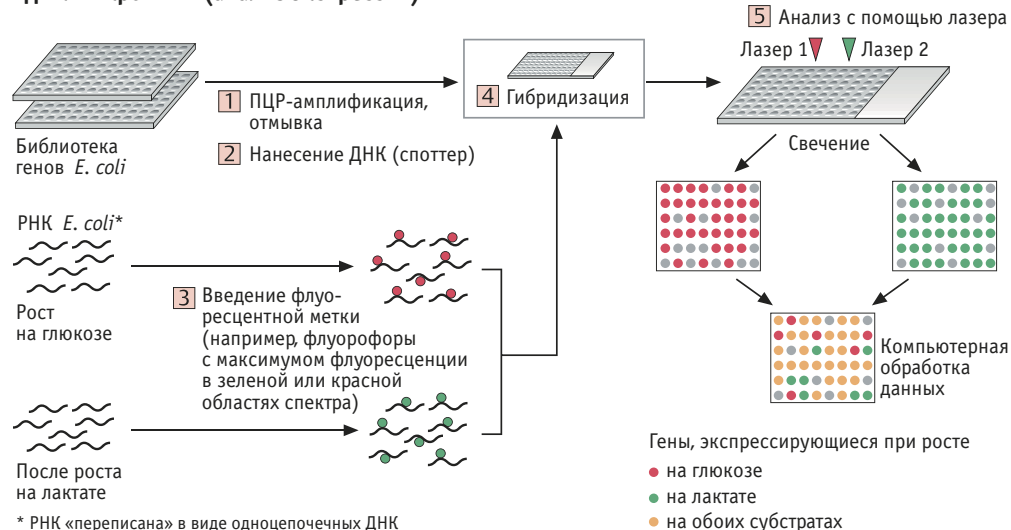
Олигонуклеотидные микрочипы



Шаблоны 1 и 2: фотолитографические шаблоны

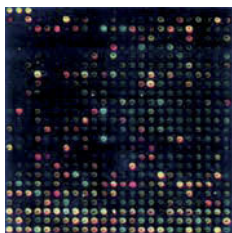
AX, GX, NX: фосфорамидиты аденозина (A), гуанозина (G) и любого нуклеотида (N)

ДНК-микрочипы (анализ экспрессии)



Области применения и методы детектирования

Плотность нанесения	Применение
Высокая, более 10 000 последовательностей ДНК	Идентификация генов, изучение характера экспрессии
Средняя, 1000–10 000 последовательностей ДНК	Поиск мутаций, аллелей, полиморфизмов
Низкая, менее 1000 последовательностей	Установление генетической предрасположенности к заболеваниям, диагностика инфекционных болезней

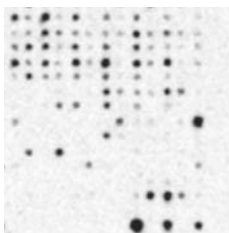


ДНК-микрочип

Гибридизация с ДНК-зондом, содержащим в качестве метки флуорофорную группу, золото и серебро

Детектирование с помощью ПЗС-матрицы, лазерного сканера (флуоресцентного излучения) или на спектрофотометре

MALDI-TOF – времяпролетный лазерный масс-спектрометр (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight)
FACS – активируемый флуоресценцией сортировщик клеток (fluorescence-activated cell sorter)



Радиоавтограмма ДНК

Гибридизация с ДНК-зондом, содержащим радиоактивную метку

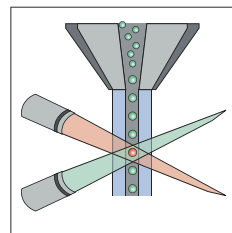
Детектирование радиоавтографически



Масс-спектрометрия ДНК

Нет ДНК-зонда; удлинение праймера – одноцепочечной ДНК без метки

Детектирование методом MALDI-TOF



Насадка (микробусины) с ДНК-зондом

Окрашенные микробусины с одноцепочечным ДНК-зондом, в каждом – две метки-флуорофора

Детектирование методом FACS

Маркерные группы

ВВЕДЕНИЕ. Маркерные молекулы имеют важное значение в фундаментальных исследованиях и прикладной биотехнологии. Их используют: 1) при гисто- и цитохимическом изучении клеток; 2) при отборе небожидимых клеток в клеточном анализаторе; 3) для визуализации комплексов, например, с ДНК или с антителами; 4) в генетической инженерии — при клонировании промоторов. Для мечения используют радиоактивные изотопы, флуорофоры, ферменты, дигоксигениновую или биотин-стрептавидиновую систему, а в качестве генетических маркеров используют гены β -галактозидазы, люциферазы или GFP (зеленого флуоресцентного белка).

РАДИОАКТИВНОЕ МЕЧЕНИЕ. Для радиоиммунного анализа белки метят с помощью ^{131}I или ^{35}S , а детектирование осуществляют на сцинтилляционном счетчике. В генетической инженерии в ДНК- или РНК-зонды вводят ^{32}P -фосфатные группы, используя ДНК-полимеразу I, фрагмент Кленова или РНК-полимеразу. Результаты гибридизации меченых фрагментов наблюдают с помощью авторадиографа. Соблюдение техники безопасности при работе с радиоактивными изотопами сопряжено с финансовыми затратами. Несмотря на это, радиоактивное мечение чаще всего используется благодаря высокой чувствительности методов детекции. Поиск новых меток и подходящих быстрых методов детекции продолжается

ФЛУОРОФОРИ. Использование таких флуорофоров, как флуоресцеин или родамин, позволяет обнаруживать вещества в пиколярных концентрациях. В гисто- и цитохимических исследованиях особенно широкое применение находят меченные флуорофорами антитела. В клеточном анализаторе FACS за одну минуту можно отделить до 1000 клеток, несущих флуоресцентный маркер. Примером использования этого метода в клеточной биологии является разделение различных типов Т- и В-клеток, имеющих на своей поверхности специфические антитела. Другой пример применения флуорофоров — поиск в смеси бактерий тех, чья 16S-рРНК гибридизуется со специфическим меченым зондом (FISH). Флуоресцентными маркерами для ДНК являются SYBR-GreenTM и бромистый этидий.

ФЕРМЕНТЫ. Преимущества ферментных меток обусловлены их мощной каталитической активностью, благодаря которой достигается высокая чувствительность при многократном усилении сигнала. Это важно при проведении анализов. Часто в качестве маркеров используются кислая фосфатаза и пероксидаза хрена. Реакции, катализируемые этими ферментами, можно изучать электрохимическими (биосенсоры), фотометрическим, а также особенно чувствительным хемилюминесцентным или флуорес-

центным методом. Эти методы имеют очень высокую чувствительность и позволяют определять концентрации веществ от пико- до аттомолей.

ДИГОКСИГЕНИН И СИСТЕМА БИОТИН/СТРЕПТАВИДИН. Это так называемые непрямые маркеры — они присоединяются к другим, настоящим маркерным группам на биомолекуле. Стероид дигоксигенин присоединяется к нуклеотиду через гидроксильную группу и не препятствует гибридизации. Для выявления гибридизовавшегося зонда, меченного дигоксигенином, используют его способность с высокой аффинностью (10^{-9} M) связываться с антителами, которые несут метку.

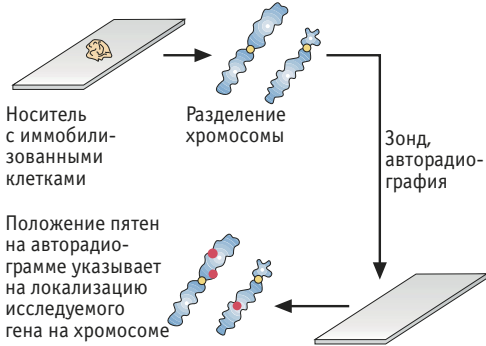
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ. Встраивание в плазмиду генов, кодирующих маркерные группы, значительно облегчает отбор клонов, несущих такую ДНК-конструкцию. При так называемом «бело-голубом» скрининге используют ген β -галактозидазы. В последовательности гена находятся сайты для встраивания чужеродной ДНК. Если плаزمид несет соответствующую вставку, синтез β -галактозидазы прекращается и ее субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (X-Gal) в среде роста не гидролизуется, а значит, не образуется продукт синего цвета. Особенно просто доказать экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP — green fluorescent protein), ген которого выделен из медузы и кодирует образование флуоресцирующих белков, не требуя никаких дополнительных субстратов. Ген GFP часто применяется как метка, для того чтобы наблюдать функционирование промоторов, которые участвуют в экспрессии или регуляции генов. Для похожих целей можно использовать ген люциферазы, который, в отличие от GFP, нуждается в специфическом субстрате люциферине и АТФ (светлячки) или деканале (фотобактерии).

Введение радиоактивной метки

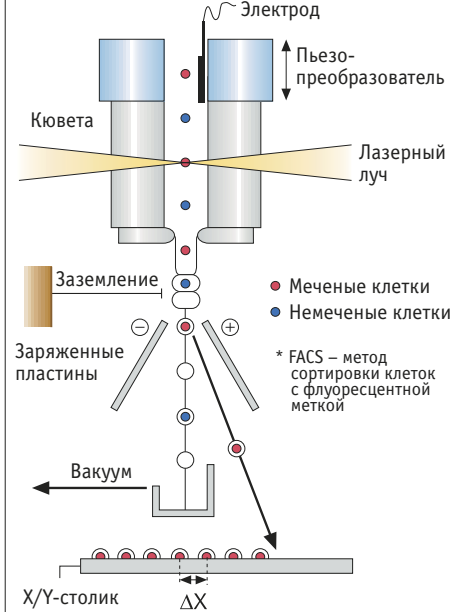
Введение ^{32}P -dATP



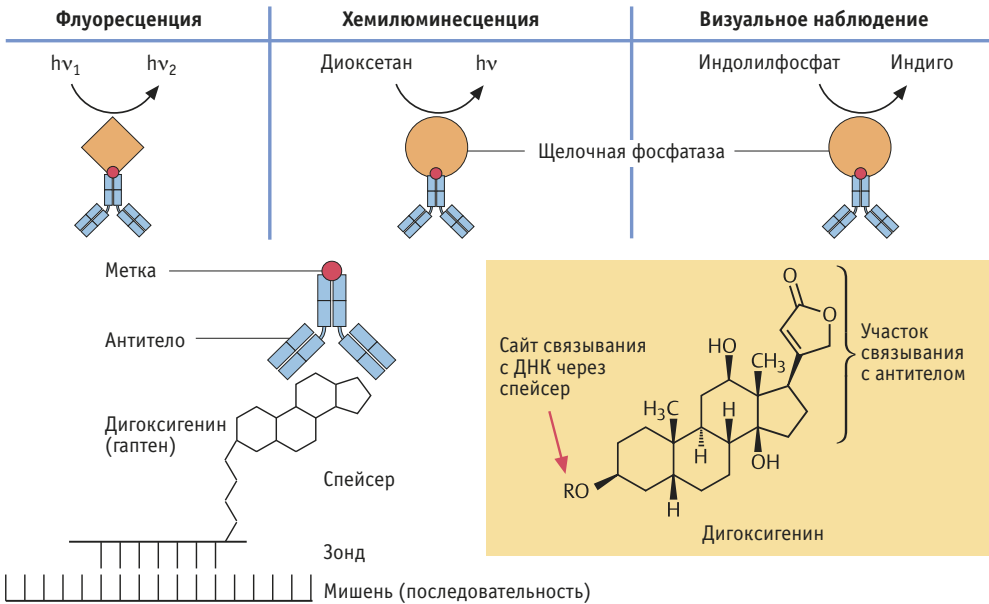
Гибридизация с радиоактивно мечеными зондами



Проточная цитометрия с использованием флуоресцентной метки (FACS*)



Оптические методы наблюдения результатов гибридизации



Часто используемые метки

Ген	Субстрат	Детектирование
<i>lacZ'</i> : фрагмент гена β -галактозидазы	5-Бром-4-хлор-3-индолил- β -D-Галактопиранозид (X-Gal)	Белый или голубой цвет
<i>lux</i> : люцифераза светляков или фотобактерий	Люциферин	Люминесценция
<i>GFP</i> : зеленый флуоресцентный белок из медузы	–	Флуоресценция

Генная терапия*

ВВЕДЕНИЕ. Среди более 15 000 известных заболеваний человека большинство (~90%) обусловлено наследственными или приобретенными генетическими нарушениями. До последнего времени такие болезни считались неизлечимыми, однако генная терапия открывает новые возможности для борьбы с болезнями. Например, уже осуществлено несколько удачных попыток замены дефектных генов человека на нормальные. К началу 2004 г. в почти 1000 медицинских проектах по генной терапии (из которых $\frac{2}{3}$ выполняются в США) участвовали уже тысячи человек. Официально разрешена только генная терапия соматических клеток. Введение генетических изменений в яйцеклетки или сперматозоиды человека запрещено, так как это может привести к изменению наследственного материала. Генная терапия может осуществляться в системе *in vivo* (т. е. генетический материал претерпевает изменения непосредственно в организме пациента) или в системе *ex vivo*, когда трансформация и размножение клеток проводятся вне организма, а затем клетки вновь вводятся в организм пациента.

ОБЩИЙ ПРИНЦИП. Генетические причины большинства заболеваний остаются до сих пор невыясненными. Однако даже при моногенных заболеваниях, молекулярная причина которых достоверно установлена, генная терапия часто затруднена, прежде всего из-за защитных реакций организма, а также внутриклеточных механизмов контроля, направленных против чужеродных нуклеиновых кислот. Все разнообразие вариантов генной терапии сводится к трем основополагающим стратегическим подходам: 1) рекомбинация дефектного гена с введенной кДНК, приводящая к встраиванию «здоровой» копии гена вместо дефектной; 2) выключение гена посредством введения антисмысловой РНК; 3) репарация дефектного гена с применением химерных конструкций из ДНК и РНК. В качестве векторов для введения ДНК в клетки человека используют, как правило, векторы на основе генома ретровирусов (25%), а также аденовирусов (28%). 16% всех экспериментов проведены с использованием несвязанной или плазмидной ДНК. В 13% случаев используют катионные липосомы (липофекция в 9% случаев), которые позволяют доставлять в клетки человека очень крупные фрагменты ДНК. Липосомы в виде аэрозоля вводят в организм человека через дыхательные пути, а затем они попадают в клетки путем эндоцитоза. Векторы на основе вирусных геномов вводят внутримышечно или непосредственно в клетки опухоли. Описаны способы трансплантации собственных клеток костного мозга после их генетической модификации (терапия ауто-

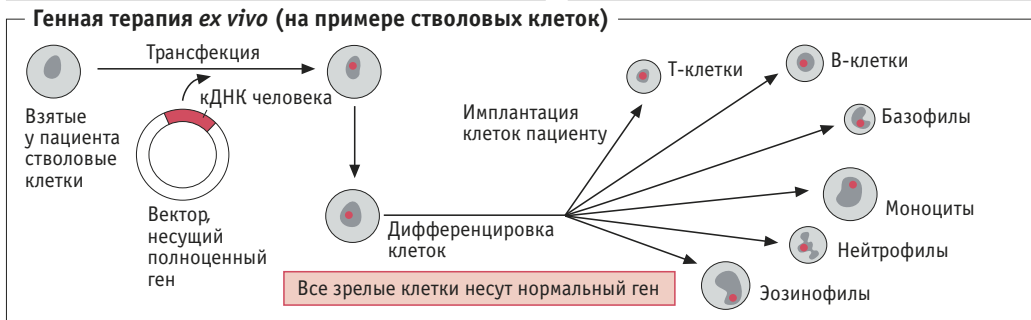
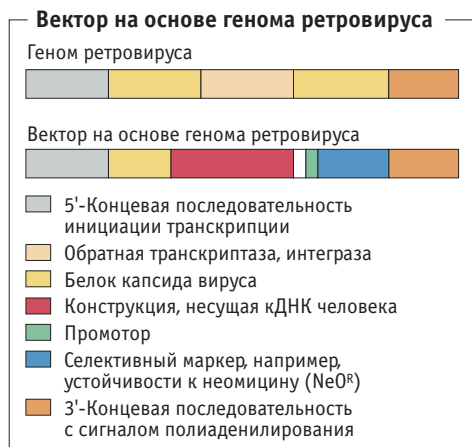
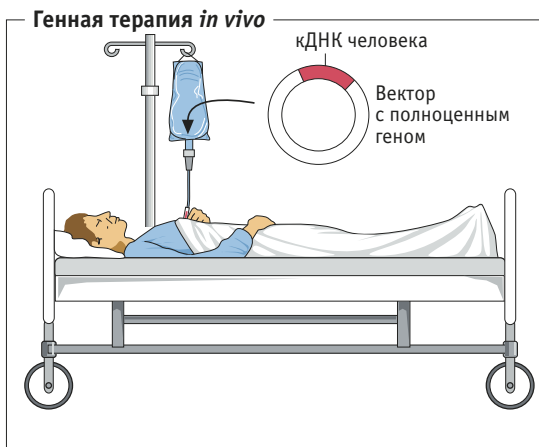
логичными клетками), а также методы прямого введения ДНК в клетки-мишени.

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ. Около $\frac{2}{3}$ всех разработок в области генной терапии направлены на терапию опухолей. Для этого используют гены, кодирующие супрессоры опухолей (BRCA1 и p53), цитокины (IL-2), антигены гистосовместимости (HLA-B7) или так называемые «суицидные» гены или (достаточно часто — 14%) гены, кодирующие антитела к клеткам опухолей. Современные методы терапии моногенных заболеваний касаются в основном *тяжелого комбинированного иммунодефицита* (SCID, *human severe combined immunodeficiency*), обусловленного дефектом гена аденозиндезаминазы. Активно изучаются также возможности генной терапии муковисцидоза — болезни, возникающей в результате повреждения трансмембранного белка.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ EX VIVO. Этот метод получил распространение, после того как впервые удалось осуществить трансплантацию клеток костного мозга. В генной терапии гематопоэтические клетки костного мозга имеют особое значение, так как они являются предшественниками всех клеток крови и клеток иммунной системы. Таким образом, если в этих еще недифференцированных клетках осуществить вне организма замену дефектного гена на здоровый и вернуть их в организм, клетки, образующиеся из них в результате дифференцировки, будут нести здоровый ген. Однако культивирование недифференцированных стволовых клеток взрослого организма — очень сложная задача, а этическая сторона использования стволовых клеток эмбрионов вызывает бурные общественные дискуссии.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ IN VIVO. Из многочисленных попыток замены дефектного гена на здоровый путем введения ДНК непосредственно в клетки организма некоторые прошли успешно. Иногда в результате осуществления генной терапии *in vivo* наблюдались значительные улучшения клинической картины заболевания: так, четверо из пятерых детей, страдающих SCID-X1, после проведения курса генной терапии смогли покинуть больницу и вернуться домой. Однако осуществление направленной генной терапии определенных органов или типов клеток пока остается неразрешенной проблемой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Теоретические и лабораторные исследования показали, что генная терапия моногенных заболеваний человека возможна, однако все еще остается множество технических проблем. После того как спонтанное размножение аденовируса, использованного в качестве вектора для генной терапии, привело к смерти пациента в США, контроль генной терапии был значительно ужесточен.



Векторы для генной терапии

Ретровирусы	Аденовирусы	Адено-ассоциированные вирусы	Липосомы	Чистая ДНК
Преимущества Стабильное встраивание в геном Недостатки Инфицируют случайным образом только делящиеся клетки	Преимущества Можно встраивать крупные фрагменты ДНК Недостатки Нестабильное встраивание в геном	Преимущества Стабильное встраивание в геном Недостатки Можно встраивать только небольшие фрагменты ДНК	Преимущества Нет риска возникновения заболевания в результате терапии Недостатки Невысокая эффективность доставки ДНК	Преимущества Нет риска возникновения заболевания в результате терапии Недостатки Невысокая эффективность доставки ДНК, нестабильная система

Применение генной терапии (2004 г.)

Заболевание	Примеры/перенесенные гены
Злокачественные опухоли (более 2000 пациентов, 675 протоколов)	Гены комплекса гистосовместимости, гены-супрессоры опухолей, суицидные гены, IL-2, IL-7 и IL-12, противоопухолевые антитела
Моногенные заболевания (более 300 пациентов, 93 протокола)	Ген SCID-ADA, муковисцидоз, фактор IX, хронический гранулематоз
Инфекционные заболевания, в основном СПИД (около 400 пациентов, 68 протоколов)	Трансгенные Т-лимфоциты, ДНК-вакцины
Другие заболевания (более 70 пациентов, 184 протокола)	VEGF121 (атеросклероз), ревматоидный артрит

Поиск биологически активных веществ

ВВЕДЕНИЕ. Поиск новых лекарств или химикатов для сельскохозяйственных нужд традиционно проводился методом *проб и ошибок*. Естественно-научные знания и новые технологии позволяют сделать этот поиск более рациональным. В основе такого подхода лежит идея о том, что биологически активные вещества действуют в организме на определенный белок (или белки), называемые мишенями. В роли мишеней могут выступать ферменты, рецепторы, белки ионных каналов, в случае растений – белки, участвующие в фотосинтезе. Анализ генома и применение методов протеомики позволяют значительно эффективнее проводить поиск мишеней. Методами генетической инженерии можно выделить эти белки, а затем изучить их взаимодействие с природными и синтетическими веществами. На основе полученных данных о структуре действующего вещества в дальнейшем возможно создание модифицированных соединений, обладающих определенной биологической активностью и некоторыми дополнительными свойствами. Скрининг с применением методов химической комбинаторики и современных биохимических данных позволяет получать новые лекарственные вещества.

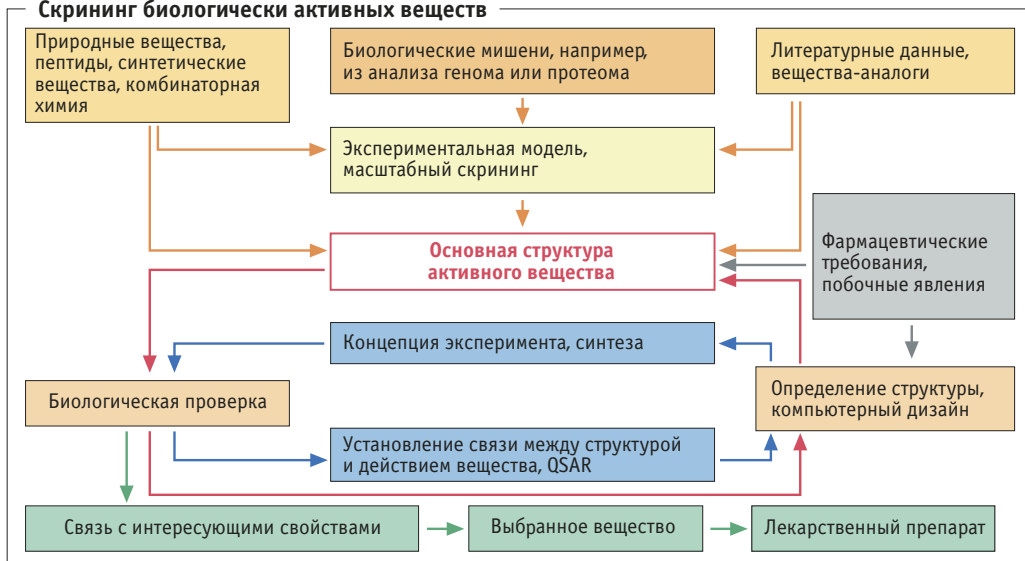
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПОЛУЧЕНИЕ МИШЕНЕЙ. Несмотря на значительный прогресс биотехнологии в последние десятилетия, идентификация мишеней, в особенности в случае полигенных заболеваний, остается весьма сложной задачей. Исследование генофонда замкнутых популяций, например в Исландии или Тасмании, и изучение геномов больных в этих популяциях способствовали определенному прогрессу в этой области. Если удалось установить связь между дефектом фермента, ионного канала или рецептора и проявлениями заболевания, на следующем этапе получают лабораторное животное, в котором «подозреваемый» ген выключен, например, с помощью антисмысловой РНК. К примеру, если G-связанный рецептор распознается как мишень, он может быть локализован в мембране фибробластов мыши. В качестве цитоплазматического репортера используют экспрессию люциферазы светляка. Как только лиганд связывается с рецептором, происходит передача сигнала путем повышения концентрации цАМФ в цитоплазме, что приводит к развитию доступного для количественной оценки люминесцентного сигнала при наличии субстрата люциферазы – люциферина.

МАСШТАБНЫЙ СКРИНИНГ. Наиболее распространенный современный метод масштабного скрининга заключается в исследовании действия веществ из обширных библиотек химических соединений (более 100 000 соединений) на мишень. Получение библиотек методом химической комбинаторики позволяет практически безгранично увеличить количество веществ в библиотеке. Такого рода измерения проводят

в 96- или 384-гнездных микротитровальных планшетах. Использование реакционных камер с объемом $\sim 10^{-9}$ л на основе травленных кремниевых плат в сочетании с конфокальной лазерной спектроскопией позволяют провести более 10 000 измерений в день. **РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.** Несмотря на то что пространственные структуры большинства белков-мишеней неизвестны, делаются попытки поиска сайтов связывания мишеней с биологически активными веществами. Для этого исследуют взаимодействие мишеней с различными синтетическими аналогами природных субстратов (QSAR – *quantitative structure – activity relationship*). Полученные данные помогают изучать структуру биологически активного вещества и усовершенствовать его в соответствии с поставленными целями (*drug design*).

ПЕРСПЕКТИВЫ. На сегодняшний день из 50 000 исследованных соединений лишь одно доходит до стадии лекарственного препарата. В год в мире появляется около 30 новых фармацевтических продуктов. Специалисты в области фармакологии надеются, что с применением направленного скрининга это число значительно возрастет. Анализ связанных с патологией полиморфизмов должен выявить возможные индивидуальные отклонения в структуре гена-мишени, вызывающие те или иные проявления заболевания. Эта информация поможет устанавливать диагноз на ранних стадиях заболевания и подбирать лекарственные средства, наиболее подходящие для каждого конкретного пациента (фармакогеномика).

Скрининг биологически активных веществ



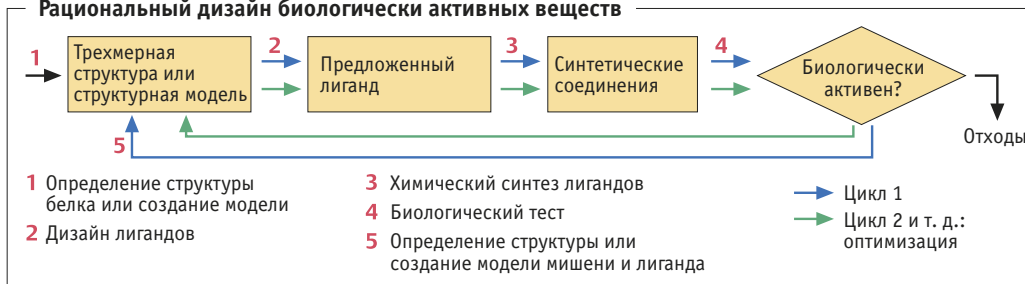
Мишени

	Количество в организме человека	Пример	Применение
Ферменты	8 000	Ацетилхолинэстераза	Болезнь Альцгеймера
Рецепторы	15 000	Рецептор серотонина	Шизофрения
Ионные каналы	3 000	Ca-канал	Болезни старческого возраста

Масштабный скрининг



Рациональный дизайн биологически активных веществ



Протеомика

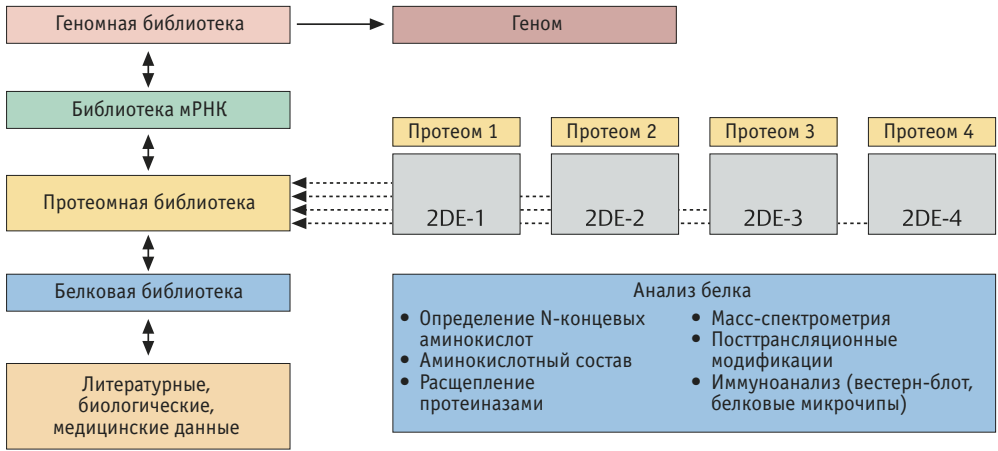
ВВЕДЕНИЕ. Термин «протеомика», предложенный в 1995 г., отражает неразрывную связь между геномом и белковым составом клетки. Считается, что у высших организмов из одного генного транскрипта в результате сплайсинга и посттрансляционных изменений образуется примерно 10 белков. Протеомика занимается изучением экспрессии, функции и взаимодействия генных продуктов на основе анализа генома (*функциональная геномика*).

МЕТОДЫ. Основным методом протеомики является выделение и анализ большого числа белков. Например, протеом *Escherichia coli* состоит из 4000 белков. Решающее значение имеет способ выделения белка: так, мембранные и растворимые белки выделяют по-разному. В случае эукариотических организмов обычно используют экстракты из клеток различных тканей: так доказывают связь белкового состава клетки с ее тканевой принадлежностью. Наибольшее распространение для изучения характера экспрессии белков получил метод двумерного электрофореза, в котором в одном направлении происходит разделение белков в соответствии с их изоэлектрической точкой, а во втором – в соответствии с молекулярной массой. При правильно подобранном диапазоне pH разрешение метода может быть достаточно высоким. Полуколичественную оценку результатов разделения в двумерном электрофорезе на ПААГ получают после окрашивания белков и сканирования геля с помощью специальных компьютерных программ. Самая совершенная система позволяет анализировать несколько сотен гелей в неделю. Особенно сложные задачи протеомики: идентификация белков, образующихся в очень малых количествах (10–1000 копий на клетку), количественная оценка содержания таких белков, установление взаимосвязи между геном и белком, подвергнутым значительным модификациям. Один из путей количественной оценки содержания белка известной структуры – использование библиотек антител. Однако часто перед исследователем стоит задача идентификации белка с неизвестной структурой. Современные технологии позволяют определить N-концевую (неацелированную) последовательность белка, если в пробе содержится более 1 мг белка. На следующем этапе проводят сравнение полученной концевой последовательности аминокислот (а с учетом вырожденности генетического кода – и участка гена) с геномной библиотекой. Для анализа многих белков, экспрессирующихся в небольших количествах, лучше всего подходит метод масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия MALDI-TOF (*matrix-assisted laser-desorption-ionization-time-of-light*) позволяет определить молекулярную массу исследуемого белка лишь приблизительно. Для более точной информации о размере белка пробу в двумерном

электрофорезе на ПААГ обрабатывают трипсином и определяют массы полученных фрагментов белка. Сравнение полученных таким образом результатов с компьютерными данными по «виртуальной» обработке трипсином белков из библиотеки позволяет сделать выводы о молекулярной массе исследуемого белка. Очевидно, что такой метод можно использовать только в том случае, если геном организма, из которого выделен белок, полностью секвенирован и протеом достаточно хорошо охарактеризован. Если же подробная информация о структуре генома не доступна, используют масс-спектрометрию ESI-TOF (*electrospray-time-of-light*). Для этого создаются белковые маркеры PTS (*protein sequence tags*), помогающие идентифицировать неизученный белок с помощью белковых библиотек. Метод позволяет идентифицировать белок при содержании нескольких сотен фемтомолей, следовательно, надо чтобы он синтезировался в клетке в количестве сотен тысяч копий.

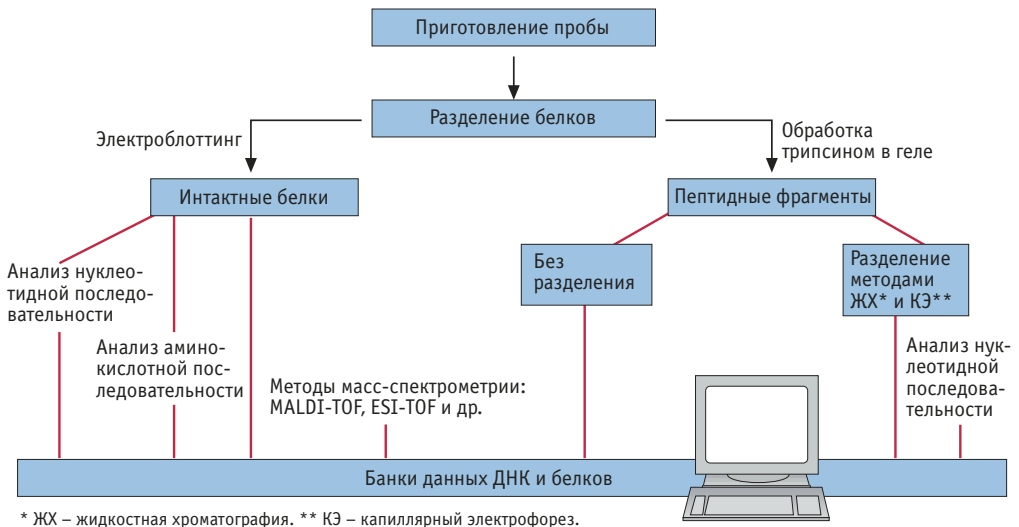
ПРИМЕНЕНИЕ. Методы протеомики позволяют изучать специфические для клетки или индуцированные внешними воздействиями изменения в характере экспрессии белков, например: 1) различия в экспрессии генов *Escherichia coli* при росте на глюкозе или на молочной кислоте; 2) экспрессия генов в β -клетках поджелудочной железы у здоровых людей и у больных диабетом; 3) токсическое действие лекарственных препаратов на экспрессию генов, например, в клетках печени. Таким способом часто удается найти «белковые маркеры» определенных заболеваний. Методы протеомики позволяют выявить функцию белка в клетке. Для этого создаются протеомные карты клеток и моделируются «клеточные фабрики», учитывающие сложные взаимосвязи между белковыми комплексами. Для изучения функции белка в клетке полезным оказывается мечение с помощью *tag*-последовательности, которая позволяет проводить аффинную очистку белка для масс-спектрометрии и окончательной идентификации.

Один геном – различные протеомы

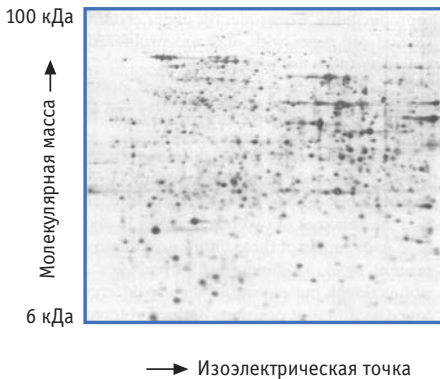


Высший организм с 30 000 генов содержит вплоть до 1 000 000 белков, уровень экспрессии которых зависит от типа клеток (10 000 белков на каждый тип клеток)

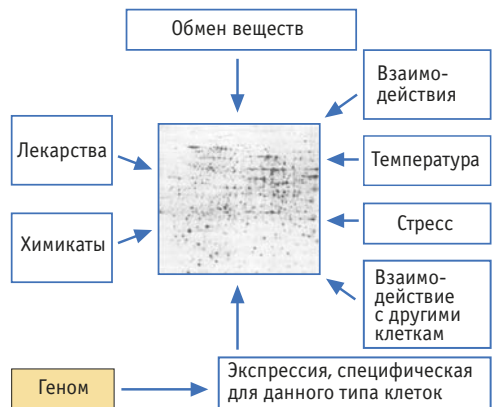
Методы протеомного анализа



Двумерный электрофорез белков пекарских дрожжей



Применение



ВВЕДЕНИЕ. Стремительное развитие молекулярной биологии в последние десятилетия было бы невозможно без прогресса компьютерных и телекоммуникационных технологий, позволяющих сохранять, упорядочивать и проводить сравнение огромных объемов информации. Интернет, созданный в 1970 г. для узких научных целей, за последние годы стал «мировой сетью», насчитывающей более 40 млн сайтов и более 100 млн пользователей по всему миру (эти числа удваиваются каждый год). Интернет сделал возможным обмен научными данными, что способствует большей продуктивности научной работы. Под термином «биоинформатика» принято понимать совокупность информации о структуре ДНК и белков (геномы и протеомы), расширяющуюся до представления о полных геномах и протеомах организмов и их функции.

ИНФОРМАЦИЯ О НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ГЕНОМОВ. Широкое распространение методов секвенирования ДНК и высокая скорость анализа привели к тому, что объемы информации в международных банках данных ДНК каждые два года увеличиваются более чем в 10 раз. Если в 1998 г. объем мировых банков ДНК составлял 2 млрд оснований, то в 2004 г. эта цифра превысила 45 млрд. Благодаря осуществлению большого числа проектов по анализу геномов, количество информации растет очень быстрыми темпами. Вся полученная к настоящему моменту информация о структуре генов объединена в трех «центральных» банках данных, созданных в США, Японии и Англии. Использование интернета позволяет исследователю сравнивать результаты секвенирования с уже имеющимися в банках ДНК последовательностями с целью выявления гомологии или идентичности. Самые большие банки информации о структуре белков – PIR (Protein Information Resource) в Вашингтоне и банк данных SwissProt; они содержат информацию о 300 000 и 200 000 белках соответственно (на конец 2004 г.).

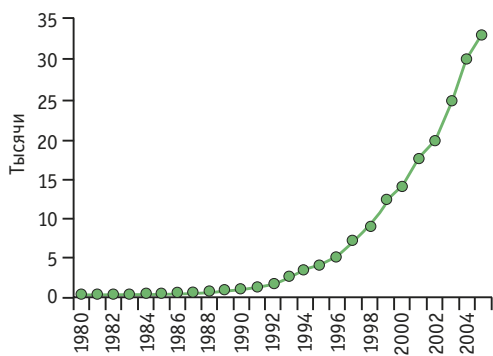
СТРУКТУРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ. По сравнению с секвенированием геномов темпы получения информации о структуре белков не такие впечатляющие. Это связано с весьма трудоемкой процедурой определения структуры белка: получение кристалла и рентгеноструктурный анализ комплекса белка с металлом – технически очень сложные задачи; особые затруднения вызывает анализ крупных белковых комплексов или мембранных белков. Двумерный ЯМР-анализ позволяет определить структуру только растворимых белков размером ~30 кДа, однако, несмотря на строгие ограничения, этим методом получена информация о пространственной структуре более 32 000 белков

(по состоянию на конец 2005 г.). За год количество проанализированных структур увеличивается примерно на 4000. Данные собраны в крупнейших банках белковых структур: PDB (Protein Data Bank) и Swiss-Prot. Интернет позволяет сравнивать любую полученную последовательность ДНК или аминокислот с уже имеющимися последовательностями в банке данных. Если уровень гомологии между полученной последовательностью и последовательностью из банка данных превышает 30%, можно построить модель пространственной организации изучаемого пептида. Банки белковых структур (SCOP, CATH) содержат информацию об «архитектурных типах» белков. Несмотря на то что теоретическое число аминокислотных последовательностей в белках очень большое (например, из 300 аминокислот можно составить 20^{300} белков), в природе белков не так много. Вторичная белковая структура (α -спирали и β -слои) накладывает определенные структурные ограничения, создавая и организуя белковую молекулу по модульному типу, поэтому число вариантов из вышеуказанного числа аминокислот уменьшается и составляет около 1500. В рамках структурной геномики изучаются возможности предсказания пространственной структуры белков на основе данных геномного анализа.

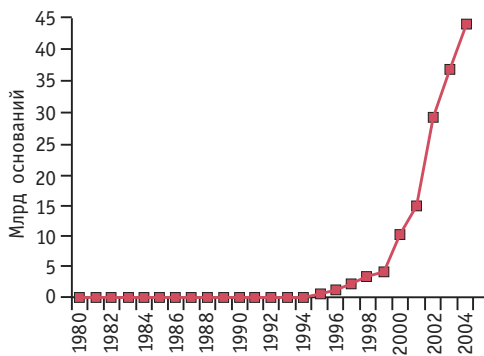
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ. Для многих подробно изученных белков, таких как ацетилхолинэстераза, протеиназы, белки ионных каналов, рецепторы и иммуномодуляторы, использование баз данных из интернета позволяет сравнивать структуру и функцию белков из разных организмов, а также проводить анализ гомологий. Конечной целью таких исследований является создание общей картины обмена веществ в организме на основе информации о его отдельных этапах (электронтранспортная цепь, гликолиз и др.).

* Леск А. Введение в биоинформатику / А. Леск; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 318 с.: ил., [4] с цв. вкл.

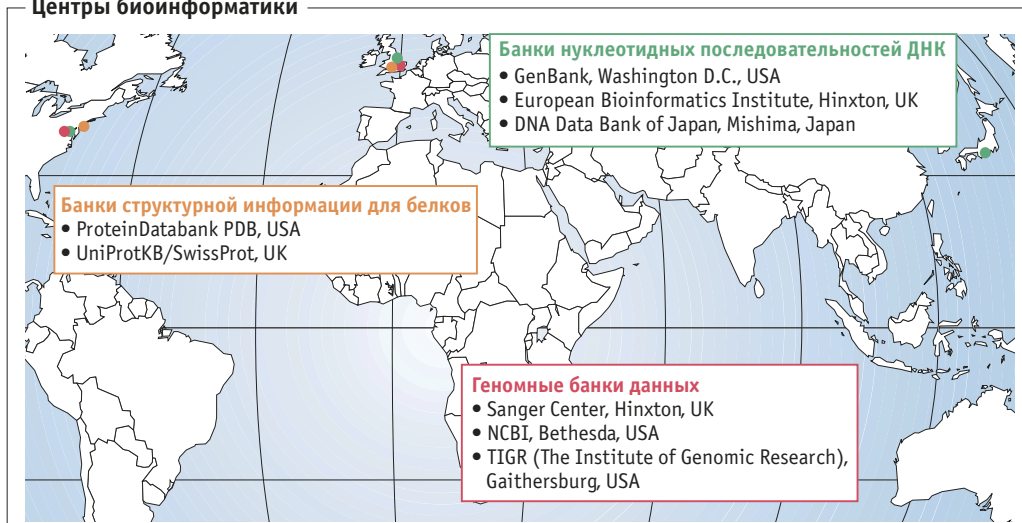
Объем банков белковых структур



Объем банков ДНК



Центры биоинформатики



Интернет-ресурсы по биоинформатике

ДНК

GenBank	~45 млрд п.н.	www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html
EMBL Database	(конец 2004 г.)	www.ebi.ac.uk/embl/index.html
DNA-Database of Japan (3 mirror sites)		www.ddbj.nig.ac.jp

Геномы

Sanger Center	Геном человека, геном мыши и др.	www.sanger.ac.uk
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	Геном человека, геном мыши и др.	www.ncbi.nlm.nih.gov
TIGR (Институт геномных исследований)	221 полный геном (середина 2005 г.)	www.tigr.org

Структурные данные

Protein DataBase	~32 000 белковых структур (середина 2005 г.)	www.pdb.bnl.gov
UniProt/SwissProt	~200 000 белковых структур и аминокислотных последовательностей (середина 2005 г.), аннотированные последовательности белков человека	www.ebi.ac.uk/swissprot

Обмен веществ

ВВЕДЕНИЕ. Огромное разнообразие форм жизни существует на Земле уже более 3 млрд лет, но и в наше время по-прежнему основные принципы обмена веществ, а также передачи и реализации генетического материала остались универсальными для всех организмов. Почти у 1 млн видов выявлено лишь несколько тысяч ферментов. У человека обнаружено несколько сотен тысяч белков, и многие из них проявляют высокую степень гомологии с белками таких простейших эукариотов, как *Saccharomyces cerevisiae*. В совокупности все происходящие процессы обмена веществ для всех форм жизни образуют сложную динамическую систему, в которой каждый живой организм играет свою роль (занимает собственную экологическую нишу). По типу обмена веществ организмы можно разделить на автотрофные, т. е. ассимилирующие CO_2 в качестве единственного источника углерода, и гетеротрофные, использующие экзогенные органические вещества. В зависимости от того, необходим ли организму кислород, все организмы подразделяют на аэробные и анаэробные (анаэробы не нуждаются в кислороде). Новые методы, позволяющие сравнивать геномы различных организмов, открывают перспективы более глубокого, детального изучения структурных и функциональных особенностей живых организмов – представителей различных экологических ниш. Удивительны те огромные успехи, которые достигнуты в понимании сложной системы процессов внутри одной клетки, внутри многоклеточного организма и, наконец, между индивидуумом и окружающей его средой (динамика биосистем, биокibernетика). Модели *in silico* при исследованиях определенных процессов становятся все более приближенными к реально существующим условиям. В биотехнологических целях становится возможным регулировать обмен веществ таким образом, чтобы получать большее количество определенного продукта и практически избавиться от нежелательных свойств организма-продуцента. Современные геноинженерные технологии значительно расширяют возможности традиционных методов селекции в растениеводстве и животноводстве.

АВТОТРОФНЫЙ ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. Организмы с этим типом обмена ассимилируют CO_2 из атмосферы и используют углерод (в восстановленном состоянии) для синтеза всех клеточных компонентов. Энергию автотрофные организмы получают различными способами: фототрофы (растения, водоросли, цианобактерии и некоторые другие организмы) используют энергию солнечного света для получения АТФ – «универсальной энергетической валюты» клетки, литотрофы окисляют неорганические вещества (S, N, ионы металлов и др.). Примером автотрофных организмов, имеющих важное значение для биотехно-

гии, могут служить трансгенные растения и нитрифицирующие бактерии. Для микробиологического выщелачивания руд используют литотрофные микроорганизмы.

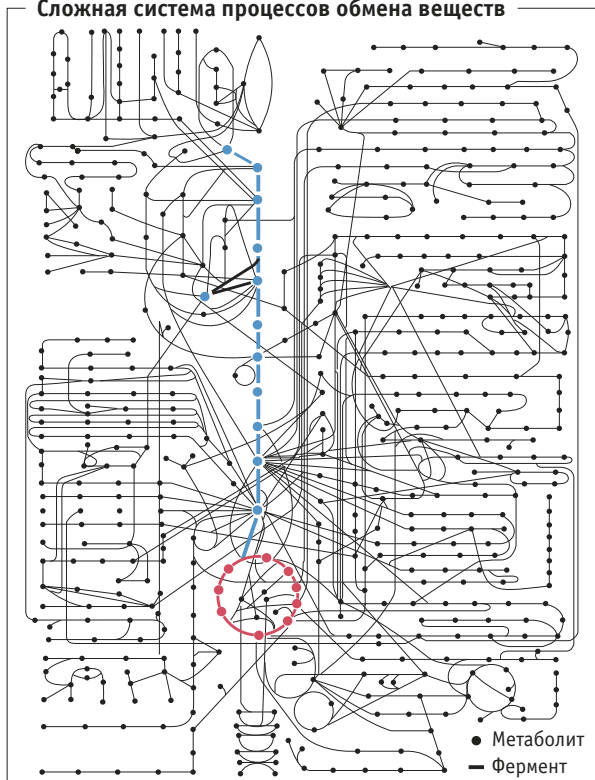
ГЕТЕРОТРОФНЫЙ АНАЭРОБНЫЙ ОБМЕН ВЕЩЕСТВ.

Анаэробные микроорганизмы с гетеротрофным типом обмена веществ находят широкое применение в современной биотехнологии, в частности, в производстве этанола, ацетона, бутанола и молочной кислоты. Эти организмы получают АТФ при разложении сахаров. Метанообразующие бактерии, которые используются при обработке сточных вод, относятся к археям и обладают специфическим типом обмена веществ. Для анаэробного обмена веществ характерна низкая энергетическая эффективность, поэтому такие организмы нецелесообразно использовать в качестве продуцентов каких-либо соединений.

ГЕТЕРОТРОФНЫЙ АЭРОБНЫЙ ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. Этот обмен веществ имеют большинство организмов, применяемых и изучаемых в биотехнологических целях. Электрон-транспортная цепь снабжает клетку энергией, которая затем используется в реакциях цикла лимонной кислоты. Выигрыш энергии в этом процессе очень большой: 26–38 моль АТФ/моль глюкозы. В реакциях цикла Кребса образуются многие промежуточные продукты – предшественники важнейших биосоединений (например, щавелевоуксусная и янтарная кислоты). С целью восполнения запасов промежуточных продуктов «работают» специальные анаэроботические ферменты. Промышленное производство таких продуктов первичного обмена, как лимонная или глутаминовая кислота, основано на анаэроботических реакциях.

ВТОРИЧНЫЙ ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. Многие организмы вырабатывают метаболиты, роль которых в обмене веществ пока не определена. Однако в промышленности широко используется способность некоторых организмов синтезировать антибиотики, алкалоиды, пигменты и вещества, обладающие специфическим ароматом.

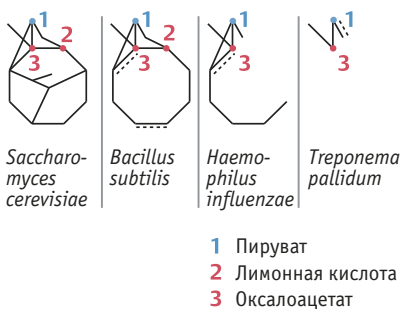
Сложная система процессов обмена веществ



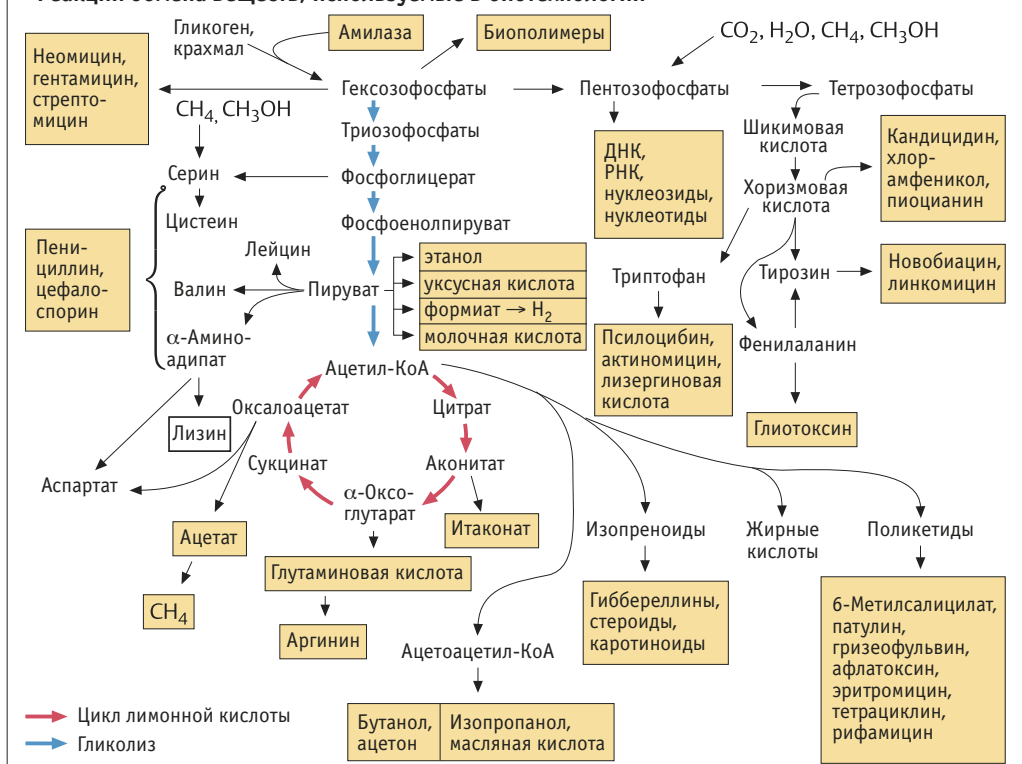
Типы обмена веществ

	Аутотрофы	Гетеротрофы
Анаэробный	Микробиологическое выщелачивание руд	Этанол Ацетон и бутанол Анаэробная переработка активного ила
Аэробный	Трансгенные растения Нитрификация	Лимонная кислота Аминокислоты Антибиотики Ферменты Витамины и т. д.

Варианты цикла лимонной кислоты



Реакции обмена веществ, используемые в биотехнологии



Метаболомика и метаболическая инженерия

ВВЕДЕНИЕ. Знания о процессах обмена веществ, их организации и способах регуляции в совокупности с современными методами математического и компьютерного моделирования позволяют следить за судьбой конкретного вещества в клетке. По результатам количественного анализа метаболитов методами ВЭЖХ–МС или ЯМР–спектроскопии высокого разрешения (методы *метабономики* и *метабономики*) можно направленно изменять методами генетической инженерии обмен веществ, механизмы регуляции и сигнализации у растений и микроорганизмов, например, с целью повышения продуктивности или расширения спектра субстратов (*метаболическая инженерия*).

ИЗУЧЕНИЕ ПОТОКОВ ВЕЩЕСТВ ПРИ МЕТАБОЛИЗМЕ.

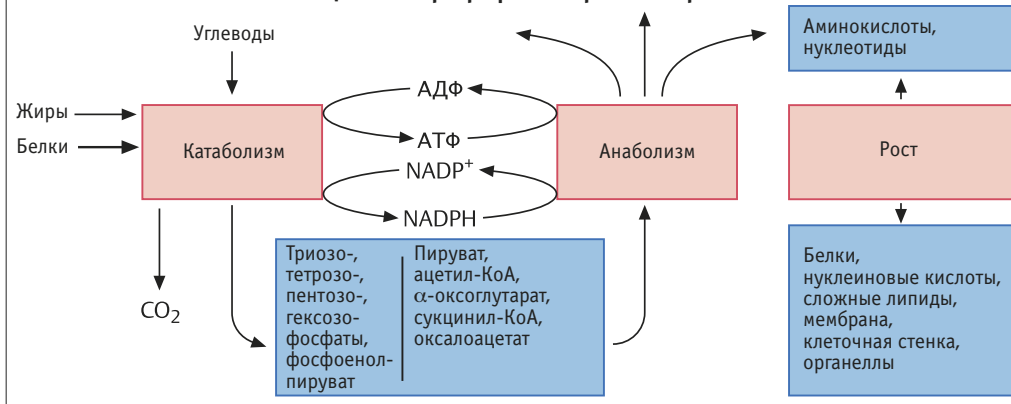
По современным представлениям, обмен веществ может быть представлен системой уравнений равновесных реакций, записанных с соблюдением стехиометрических соотношений реагирующих веществ. Для некоторых веществ таким образом удается описать все их превращения в клетке. При этом для достоверности картины необходимо определить потоки веществ через цитоплазматическую мембрану (поступающие субстраты \rightleftharpoons образующиеся продукты). Однако для большинства веществ последовательность превращений в клетке до сих пор окончательно не выяснена. Важная информация, особенно когда предполагается существование нескольких путей обмена, может быть получена из результатов измерения ферментативной активности, изучения профиля экспрессии белков с помощью микрочипов и наблюдения за судьбой меченых соединений в клетке. При этом используется, как правило, мечение радиоактивными и стабильными изотопами (^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{32}P и ^{35}S). Меченые соединения содержатся в среде роста, и за их попаданием в клетку и дальнейшими превращениями наблюдают методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) или масс-спектрометрии (МС). Результаты такого анализа с помощью изотопомеров (изотопы–изомеры) и данные о биохимии процессов в некоторых относительно простых случаях позволили составить математическую модель разветвленного пути обмена или даже полную картину превращений вещества в клетке.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА. Для обнаружения фермента, свойства которого определяют самую медленную реакцию в процессе образования продукта, необходимо выстроить иерархию регуляторных взаимодействий, т. е. выяснить роль каждого фермента в регуляции процессов. Как правило, на активность фермента в клетке влияют несколько факторов (веществ, ферментов), и каждый фермент в свою очередь оказывает регуляторное действие на другие ферменты. Для того чтобы установить роль фермента в этих сложных взаимодействиях, методами гене-

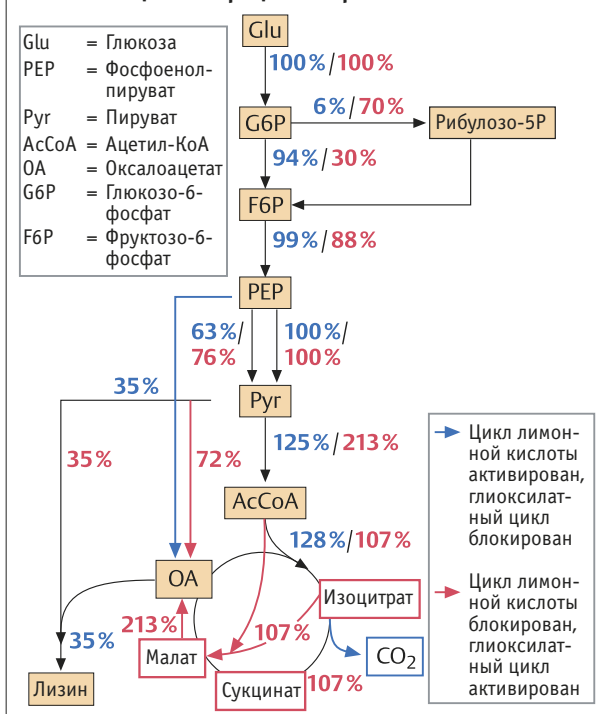
тической инженерии уменьшают количество копий гена этого фермента в геноме и наблюдают за количественными изменениями при биохимических реакциях в клетках. Другой подход к изучению регуляции заключается в математическом моделировании динамики этих процессов. Этот подход применением в тех немногих случаях, когда известна полная последовательность реакций образования продукта со всеми побочными процессами. Для проверки математической модели определяют количества метаболитов, образующихся на разных стадиях. С этой целью клеточную культуру, достигшую стационарного состояния, активируют, например, путем добавления глюкозы в среду роста и изучают ответ системы, измеряя концентрации компонентов клеточного пула.

ПРИМЕНЕНИЕ. Благодаря относительно простой организации микроорганизмы изучены значительно лучше, поэтому методы «метаболической инженерии» пока применимы исключительно к этим объектам. Изменения в обмен веществ микроорганизмов вносят с различными целями: а) расширение спектра веществ, которые могут подвергаться микробной деградации (экологическая задача); б) увеличение интенсивности образования полезных для человека метаболитов. Так, в результате клонирования генов лактозного оперона в *Zymomonas mobilis* (промышленный продуцент этанола) и *Corynebacterium glutamicum* (продуцент глутаминовой кислоты и лизина) эти микроорганизмы приобрели способность использовать молочную сыворотку в качестве источника углерода. В результате генно-инженерных манипуляций были получены клетки штамма *Pseudomonas sp.* B13, способные разлагать хлорсодержащие и метилированные ароматические соединения. В промышленном производстве первичных (аминокислоты, этанол и другие спирты, биополимеры, витамины) и вторичных метаболитов (антибиотики) широко используются рекомбинантные микроорганизмы, полученные методами метаболической инженерии. Например, по сравнению с дикими клетками выход лизина увеличивается на 50% на штаммах *C. glutamicum*, которые удалось получить после изучения конкурирующих реакций путей биосинтеза и секреции лизина и внесения соответствующих изменений в геном.

Основные этапы обмена веществ гетеротрофного аэробного организма



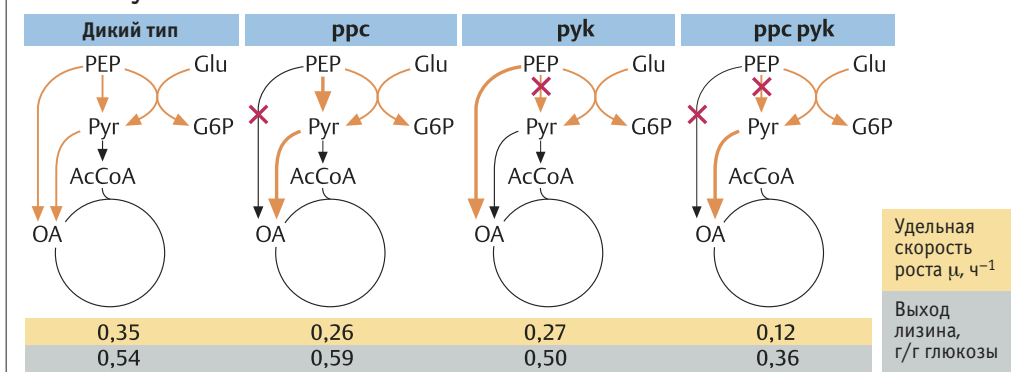
Поток веществ в процессе образования лизина



Анализ метаболитов методом ЯМР



Анализ мутантов



Системная биология

ВВЕДЕНИЕ. Системная биология — это новое направление в биологии, задача которого дать целостное описание функций клетки или организма. Для этого функциональные элементы метаболизма и относящиеся к ним регуляторные и сигнальные молекулы объединяют в функциональные модули, что в совокупности и составляет клетку. Такая модель клетки, основанная на экспериментальных результатах, допускает интерактивные подходы при предсказании клеточных функций. Подобное системное описание клетки сравнимо с динамическим картированием, описывающим потоки метаболитов, их количественную динамику и систему их регуляции.

ЧТО ЖЕ ГЛАВНОЕ? Прежде чем что-либо предполагать или моделировать для клетки или другой биологической системы, надо получить данные о строении этой системы. Это прежде всего информация о функциях и взаимодействиях генов, белков, особенностях обмена веществ и механизмах управления ими. Клетки динамически реагируют на внутренние и внешние факторы. Реакции обмена веществ в живых системах можно описать, моделируя поведение клетки при строго определенных условиях. Чтобы минимизировать функциональные нарушения, необходимы контрольные факторы. Конечная задача состоит в том, чтобы создать действующую модель исследуемой биосистемы с взаимосвязанными функциональными модулями.

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ. В сложной биосистеме при любом анализе регуляторных процессов необходимо располагать обширными базами данных. К примеру, должны быть известны последовательности и профили экспрессии генов (геном и транскриптом), затем из них выводятся данные о белках (протеом) и метаболитах, участвующих в работе клетки (метаболом). Транскриптом может быть описан при изучении профилией экспрессии мРНК с использованием ДНК-чипов. Данные о протеоме получают с использованием двумерного электрофореза, причем с целью получения информации о сигнальных путях можно изучать кинетику фосфорилирования белков, например, методом масс-спектрометрии. Измерения концентраций сотен метаболитов в ответ на воздействие (например, добавление глюкозы) часто происходит очень быстро и требует проведения измерений в миллисекундном временном диапазоне. Пробы в таких анализах отбирают с помощью автоматических пипеток, а сам анализ проводится методами ВЭЖХ–МС при строго контролируемых условиях. Часто при мечении стабильными изотопами (^{13}C , ^{15}N) содержание метаболитов анализируют масс-спектрометрически и методом ЯМР.

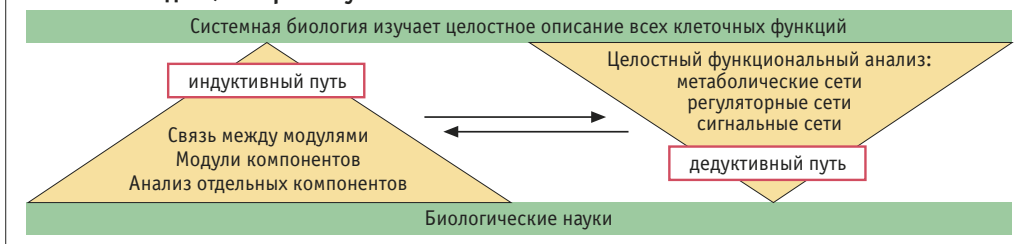
НАДЕЖНОСТЬ. Биосистемы имеют очень важную особенность: клетка или целый организм сохраняет устойчивость, даже когда один из модулей выходит

из-под контроля. К фенотипическим проявлениям этой стабильности относятся: 1) способность клетки или организма приспособиться к изменившимся условиям среды; 2) невысокая чувствительность соответствующих кинетических параметров; 3) постепенное угасание жизненных функций при сильных нарушениях (а не резкое их блокирование). Эти свойства обеспечивает система множественного контроля благодаря наличию положительной и отрицательной обратной связей, избыточности и стабильности жизненных функций, модульной их организации, которая означает физическую или функциональную изоляцию компонентов системы: клетка сохраняет жизнеспособность, даже когда один компонент прекращает функционировать.

МЕТОДЫ РАСЧЕТА И ПРИБОРНОЕ ОСНАЩЕНИЕ. В системную биологию это оснащение попало из технических дисциплин, что позволило проводить интеграцию данных, планировать эксперимент, визуализировать и анализировать сложные системы. Поэтому существуют многочисленные программы, созданные для модельных исследований. Примером программного пакета на основе формата XML, разработанного специально для системной биологии, может служить Systems Biology Mark-Up Language (SBML). Этот пакет уже стал стандартом при обеспечении накопления и обмена информацией в области исследований *in silico*.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ. Постановка и решение задач системной биологии в настоящее время осуществляется в рамках международных проектов. Спектр этих проектов широкий: от функционирования микроорганизмов (*E. coli*, дрожжи) и различных типов клеток человека (гепатоцитов, нейронов) до проблем диетологии и фармакологии.

Основные задачи, которые изучает системная биология



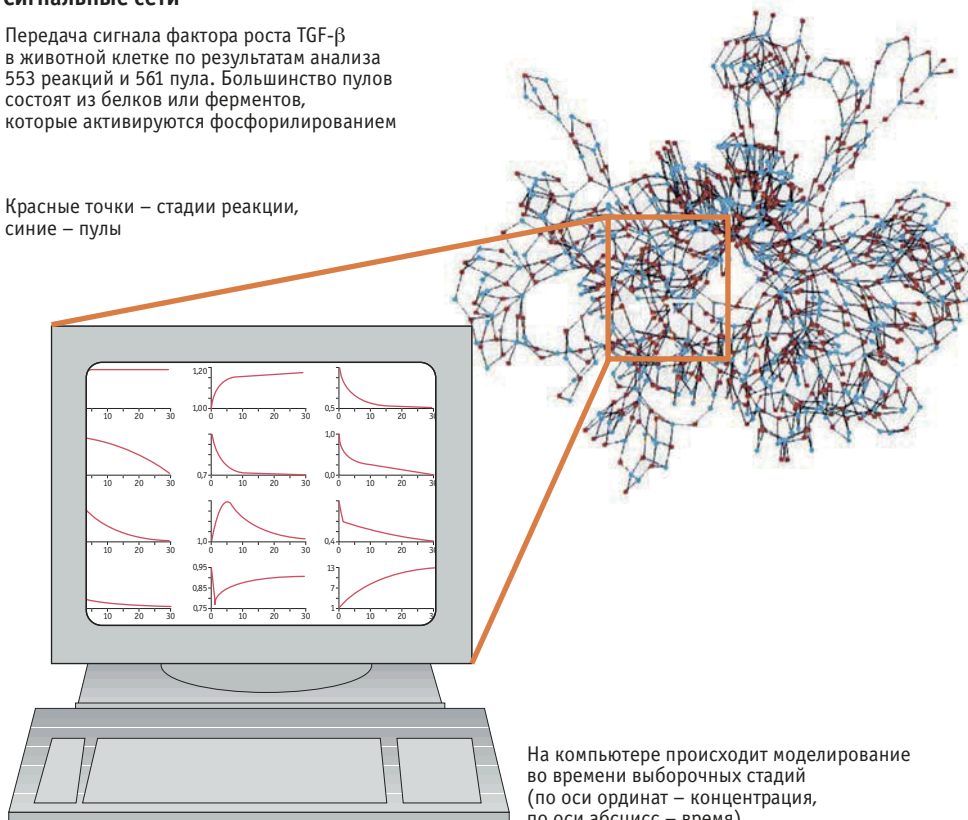
Термины и экспериментальные методы

Термин	Анализ количественных данных	Методы
Метаболом	Метаболиты	Роботизированная быстрая хроматография – масс-спектрометрия с изотопным мечением (^{15}N , ^{13}C), ЯМР высокого разрешения растворов сложного состава, фурье-спектрометрия)
Геном	Последовательности и функции генов	Определение нуклеотидных последовательностей, нокаут гена
Транскриптом	Реакции образования мРНК	Изучение профилей экспрессии с кДНК-чипами
Протеом	Реакции синтеза белков и их модификация	Двумерный гель-электрофорез или капиллярный электрофорез, MALDI-TOF или масс-спектрометрия с электроспреем
Интерактом	Различные белок-белковые взаимодействия	Двухпочечные гибридные системы, атомно-силовая микроскопия, флуоресцентная спектроскопия (FRET)

Сигнальные сети

Передача сигнала фактора роста TGF- β в животной клетке по результатам анализа 553 реакций и 561 пула. Большинство пулов состоят из белков или ферментов, которые активируются фосфорилированием

Красные точки – стадии реакции,
синие – пулы



«Белая» биотехнология

ВВЕДЕНИЕ. Почти все общее энергопотребление и поставки сырья для химической промышленности обеспечивают месторождения нефти и природного газа, но однажды эти природные «кладовые» могут истощиться. Для устойчивой хозяйственной деятельности служат прогнозы на среднесрочную перспективу относительно запасов энергоносителей и сырья, в которых должна быть отражена не только экономическая эффективность, но и отдано предпочтение технологиям, основанным на возобновляемых ресурсах, безопасных для окружающей среды. При таких оценках используют специальный показатель экоэффективности. Многие продукты и энергоносители могут быть получены путем биопереработки, основанной на активности биологических катализаторов (ферментов, микроорганизмов), т. е. методами «белой» биотехнологии.

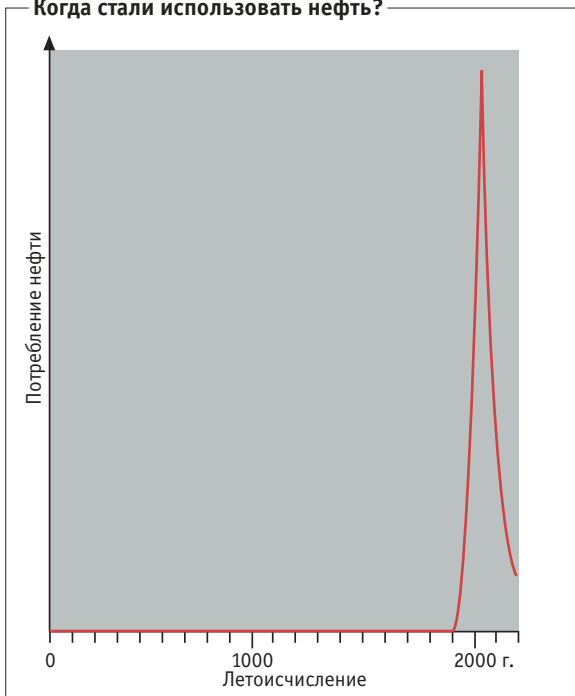
ОЦЕНКА ЭКОЭФФЕКТИВНОСТИ. В настоящее время для химических процессов необходимо не только экономическая, но и экологическая экспертиза. Методики экспертиз могут быть различными, но главное, на что обязаны обращать внимание эксперты, это соблюдение принципа рационального природопользования, а также выход продукции, энергетические затраты и объемы выбросов (отработанного воздуха и газов, сточных вод, шлаковых отходов и т. д.). При использовании токсичных и огнеопасных материалов также оценивают различные риски. Путем сравнения нескольких технологий делаются рекомендации, какая может быть предпочтительной. Именно так фирма BASF выбрала технологию получения индиго. Как правило, самые оптимальные показатели у биотехнологий.

БИОПЕРЕРАБОТКА. Концепция биопереработки основана на использовании возобновляемых ресурсов (целлюлозы, лигнина, гемицеллюлоз, крахмала, растительных масел), включая ГМО-растения. В настоящее время в промышленности используются две различные технологии биопереработки: первая — на основе лигнина и целлюлозы (сырье — солома, отходы сахарного тростника, древесина или бумажные отходы) и вторая — на основе сельскохозяйственных растений (кукуруза, рожь или пшеница — сырье для производства продуктов питания). Технология биопереработки, где сырьем служит зеленая масса клевера, люцерны или укосной травы, считается самой экологичной. Установки для получения биоэтанола или полилактида из крахмала — первые прототипы современных промышленных комплексов биопереработки.

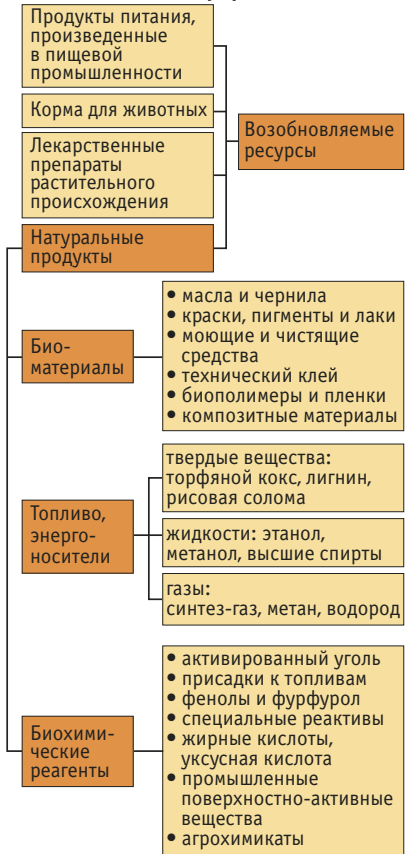
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСТОЧНИКИ ЭНЕРГИИ. В качестве источников энергии на основе возобновляемых ресурсов в настоящее время получили применение биоэтанол, «бiodизель» или биогаз. В перспективных исследованиях разрабатываются топливные элементы

на основе водорода. Большой интерес вызывает биоэтанол. Из-за энергетического дефицита во многих промышленно развитых странах принята программа крупномасштабного получения биоэтанола. В США в рамках Национальной программы к 2020 г. планируется увеличить долю биоэтанола с 0,5 до 10%. Похожие задачи поставлены в странах ЕС, в Японии и в Китае. Предложена технология производства «бiodизеля» из отходов производства жиров и растительных масел (щелочной метанолиз ацилтриглицеринов оказался выгоднее, чем ферментативный процесс с применением липаз). «Бiodизель» уже применяется как топливо. Безотходная технология производства биогаза ($\frac{2}{3} \text{CH}_4 + \frac{1}{3} \text{CO}_2$) из биомассы путем аэробного брожения уже нашла применение в стационарных энергетических установках на сельскохозяйственных предприятиях. В 2005 г. в Германии около 3 млн домов снабжались биогазом. Большие надежды возлагаются на использование водорода в качестве энергоносителя. Главное преимущество водородных топливных элементов по сравнению с двигателями внутреннего сгорания — более высокая теоретическая эффективность. По сравнению с водородом, который получен обычными методами из природного газа или же из «бiodизеля», биогаза и других источников, топливные элементы на основе биоводорода могут привести к повышению энергетической эффективности природного круговорота CO_2 . Биоводород можно получать при биофототоллизе воды (водоросли и цианобактерии), при фоторазложении органических веществ и биомассы (фотосинтезирующие бактерии) или путем бактериальной ферментации (биомасса как источник энергии). В настоящее время светозависимый процесс расщепления молекул воды пока еще не используется, так как имеет один недостаток: H_2 -продуцирующие ферменты (гидрогеназы) ингибируются кислородом.

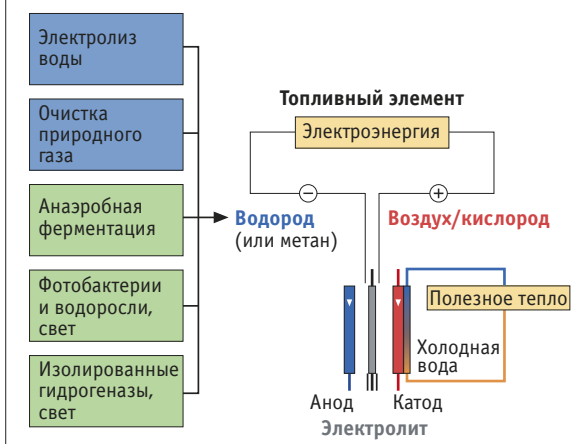
Когда стали использовать нефть?



Концепция биопереработки

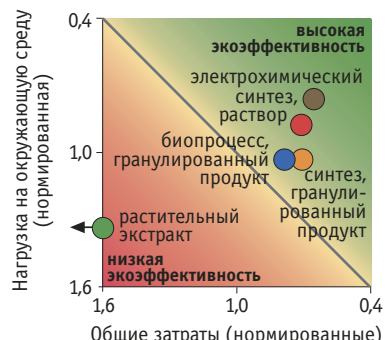
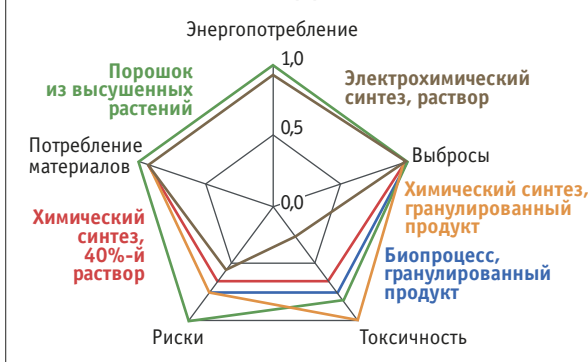


Водородные технологии



Предприятие Cargill Plant в Блэре, Небраска. Этот комплекс биопереработки производит изоглюкозу, этанол, молочную и 3-гидроксипропановую кислоты и другие химикаты из возобновляемых природных ресурсов (кукурузы и сои).

Технология индиго: экоэффективность



Техника безопасности при проведении генно-инженерных манипуляций

ВВЕДЕНИЕ. Высокий уровень квалификации персонала, соблюдение техники безопасности, грамотная оценка рисков и подробная документация всех стадий работы — все это позволяет минимизировать риски при генно-инженерных манипуляциях. В случае биологических исследований особенно важно оценить действительно ожидаемые риски при проводимых работах, что определяется свойствами переносимых генов, особенностями используемого вектора и организма-хозяина. Очень важно учитывать экологические последствия попадания трансгенных организмов в природную среду. Во всех развитых странах действуют законодательные акты, направленные на предотвращение экологических катастроф, связанных с биологическими исследованиями. Так, в странах ЕС принят закон о генно-инженерных исследованиях, который заложил основы национальных программ. В США законодательную силу имеют директивы Национального института здравоохранения (NIH).

КВАЛИФИКАЦИЯ ПЕРСОНАЛА. Все сотрудники, участвующие в генно-инженерных исследованиях, должны обладать соответствующей профессиональной подготовкой и строго соблюдать технику безопасности. Руководить генно-инженерными работами, быть ответственным за соблюдение техники безопасности и составлять отчеты о проведенных работах может только высококвалифицированный специалист в должности руководителя проекта.

ТРЕБОВАНИЯ К ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТЫ. Лаборатории, в которых планируется проведение генно-инженерных работ, должны быть проинспектированы специальным уполномоченным. На входе в эти помещения обязательно размещение соответствующих табличек с указанием, что доступ туда ограничен. Дополнительные инженерные конструкции и другие материальные средства в этих лабораториях (например, вытяжные шкафы, дополнительные средства дезинфекции) устанавливаются в зависимости от уровня опасности проводимых работ (уровни S1–S4). По окончании исследований ГМО-организмы подлежат обязательному уничтожению. Уровень системы контроля сточных вод, воздушных выбросов и твердых отходов также зависит от рисков при проводимых работах. Все сотрудники, принимающие участие в экспериментах, начиная с уровня S2, должны регулярно проходить медицинское обследование. Области использования генетически модифицированных организмов (ГМО) строго ограничены. Во многих странах для проведения исследований, начиная с уровня S2, требуется специальное разрешение на эти работы, для получения которого необходимо представить подробное описание планируемых работ и обосновать их цель.

ДОКУМЕНТАЦИЯ. О проведении генно-инженерных работ должны быть своевременно информированы соответствующие службы научно-исследовательского института или предприятия. В Германии необходимо получить специальное разрешение на работы, начиная с уровня S2. Уровень риска планируемых работ устанавливает Центральная комиссия по биологической безопасности при Институте Роберта Коха. Все стадии генно-инженерных работ должны быть подробно описаны в протоколах. Для работ уровня S1 срок хранения протоколов — 10 лет, а для работ более высокого уровня риска — 30 лет.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ РИСК определяется а) опасностью исследуемого продукта, б) патогенностью используемых в работе организмов, в) патогенными свойствами использованного вектора (если таковой имеется). Таким образом, биологические риски оцениваются суммой отдельных показателей. Большинство стран в этом вопросе придерживается директив NIH, согласно которым выделяют четыре уровня опасности биологических работ для здоровья человека и окружающей среды:

S1 — отсутствие риска,

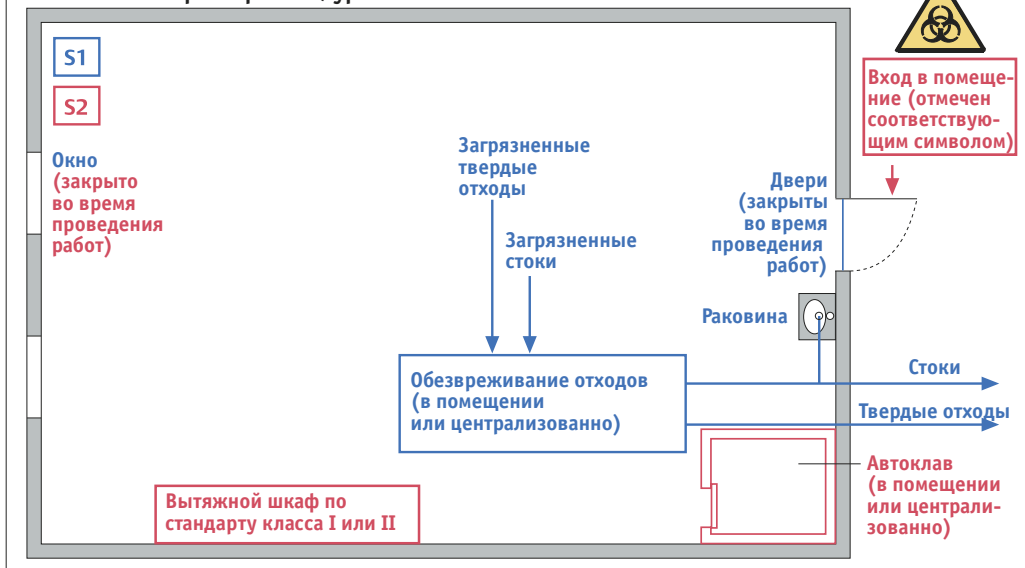
S2 — малый риск,

S3 — средний риск,

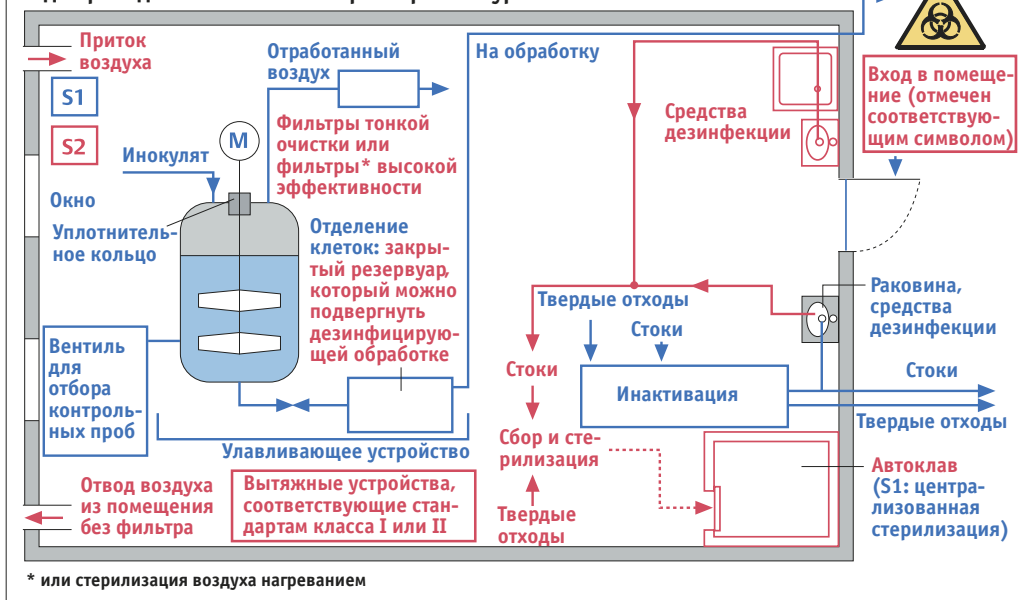
S4 — высокий риск (установленный или предполагаемый; например, ситуация, когда используются патогенные организмы с целью изучения методов лечения инфекционных заболеваний и в других случаях).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РИСКИ ДЛЯ ЭКОЛОГИИ. Трансгенные животные, растения и микроорганизмы, которые были применены, например, при очистке сточных вод, при попадании в окружающую среду могут вызывать экологические последствия. Поэтому использование ГМО-организмов в природе пока не продвинулось дальше обсуждения. Тем не менее в США и в Канаде многие трансгенные растения разрешены для высадки в открытый грунт, но в странах ЕС и в Японии эти работы находятся под очень строгим контролем. На использование рекомбинантных микроорганизмов в природных условиях в США, странах ЕС и Японии объявлен мораторий.

Организация лаборатории, в которой проводятся генно-инженерные работы, уровня S1 и S2



Организация отдела на промышленном предприятии где проводятся генно-инженерные работы уровня S1 и S2



Оценка риска при использовании ГМО-организмов

	Риск для человека и окружающей среды	Примеры
S1	Отсутствует	Лабораторные штаммы <i>Escherichia coli</i> , дрожжей, трансгенные растения и животные
S2	Малый	Некоторые штаммы <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>
S3	Средний	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , вирусы растений, вирус гепатита
S4	Высокий	Опасные патогенные микроорганизмы, вирусы Эбола, Ласса

Сертификация биотехнологической продукции

ВВЕДЕНИЕ. Производство и использование биотехнологических продуктов строго контролируется в соответствии с Законом о защите прав потребителя. Правила сертификации в разных странах основаны на одних и тех же принципах. Остановимся на сертификации а) биофармацевтической продукции и б) продуктов питания.

ПРОЦЕДУРА СЕРТИФИКАЦИИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ. Сертификация фармацевтических продуктов находится в компетенции организаций здравоохранения: в США — Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарств (FDA), в Германии — Государственный институт лекарственных средств и медицинской промышленности Министерства здравоохранения (BfMg). На общеевропейском уровне координацию национальных экспертиз осуществляет Европейское агентство по контролю за оборотом лекарственных средств (EMA) в Лондоне. Получению сертификата предшествуют: а) тщательное изучение механизма действия и возможных побочных эффектов; б) составление подробной документации, касающейся метода получения; в) полноценный контроль качества. В процедуре сертификации выделяют несколько этапов. В доклинических исследованиях проверяется биохимическая активность препарата и проводятся испытания на лабораторных животных с целью контроля его безопасности. В случае положительных результатов доклинических исследований вещество получает статус «препарата, допущенного к клиническим испытаниям». На первой (I) фазе клинических испытаний препарат назначается небольшой группе здоровых добровольцев (контроль безопасности), на второй (II) фазе — сравнительно большей группе пациентов (контроль безопасности и действия), на заключительной третьей (III) фазе — массовые испытания в крупных клиниках. Затраты на проведение клинических испытаний обычно превышают 100 млн долларов США, общая продолжительность клинических испытаний при сертификации синтетических препаратов (химических соединений) составляет 11 лет, а для биофармацевтических препаратов — 9 лет. После тщательного анализа всех полученных данных принимается решение о выдаче сертификата. По статистике, из 5000 препаратов, успешно прошедших доклинические исследования, лишь один препарат получает сертификат. Параллельно с проведением клинических испытаний создается подробная документация, относящаяся к получению препарата. При этом особое внимание уделяется очистке продукта от загрязнений химической, микробиологической или генетической природы.

СЕРТИФИКАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ. Из многочисленных продуктов питания, полученных методами генетической инженерии, приведем лишь несколько примеров: трансгенные овощи, фрукты, мясо и рыба, обладающие измененными свойствами по сравнению с природными; мука и сахар, полученные с использованием генетически модифицированных микроорганизмов; пищевые добавки (декстрины и ксантан) — вещества, обнаруженные в природе и полученные в виде рекомбинантных продуктов. В США такие продукты используются с 1996 г., и ни разу не возникало никаких осложнений. В странах ЕС, согласно директиве о «новых пищевых продуктах», производитель обязан указывать на упаковке товара, что продукт был получен методами генетической инженерии. Исключения составляют природные или рекомбинантные ферменты (например, химозин).

ТРАНСГЕННЫЕ ОРГАНИЗМЫ В ПРИРОДЕ. В США с 1995 г. законодательно разрешено нахождение в природной среде трансгенного организма после 20-летнего наблюдения в лабораторных условиях, однако это требует обязательного информирования организаций, контролирующих экологическую безопасность. Этот закон касается трансгенных микроорганизмов, растений и животных (в том числе их распространения через торговую сеть или иным образом). В США использование трансгенных семян не имеет ограничений. В Европе с 2004 г. разрешено использование генетически модифицированных (ГМ) растений и произведенных из них пищевых продуктов и кормов. Использование ГМ-растений и продуктов, полученных с применением ГМ-организмов, строго регламентируется, при этом требуется обязательная маркировка — ГМО. Научная экспертиза осуществляется Европейским ведомством безопасности пищевых продуктов (EFSA) в Парме. В Германии законодательство о ГМО, введенное с февраля 2005 г., соответствует европейскому, например это касается требований к методам идентификации ГМО-продуктов, сертификации, ограничений на гены, устойчивые к антибиотикам, и сроков допуска ГМО-продукции, которые установлены в 10 лет. Контроль за выполнением Закона возложен на Федеральное ведомство по защите прав потребителей (BVL), представительства которого есть в Берлине, Бонне и Браншвейге.

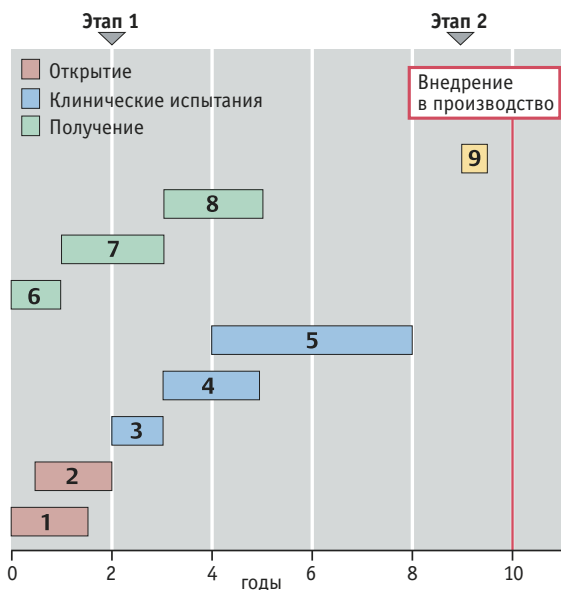
Уровень продаж фармацевтической продукции (2004 г., некоторые предприятия Германии)

«Малые молекулы» (синтетические препараты)	37
Антитела и фрагменты антител	18
Рекомбинантные белки	17
Прочее	28

Благодаря коротким срокам получения допуска прослеживается тенденция на применение биопрепаратов

В 2004 г. в ЕС и США были допущены к употреблению около 60 биопрепаратов

Сертификация фармацевтических препаратов



- 1 Открытие
 - 2 Испытания на животных
 - 3 I фаза клинических испытаний; проверка безопасности препарата на группе здоровых добровольцев (20–30 человек)
 - 4 II фаза клинических испытаний; проверка действия препарата на больных (100–300 пациентов)
 - 5 III фаза клинических испытаний; массовые испытания в крупных клиниках (1000–5000 пациентов)
 - 6 Разработка технологического процесса
 - 7 Конструирование оборудования
 - 8 Проверка на соответствие GMP
 - 9 Инспектирование
- Этап 1** Регистрация препарата в качестве «препарат, допущенный к клиническим испытаниям»
- Этап 2** Передача технологии на предприятие

Авторское право действует 22 года

Критерии для выдачи сертификата

Действие	Действие медицинского препарата должно быть доказано, препарат не должен представлять опасности для общества*
Безопасность применения	По результатам доклинических и клинических испытаний оцениваются возможные побочные эффекты, они должны быть менее значительными, чем терапевтическое действие препарата
Безопасность производства	Процесс производства должен соответствовать принятым стандартам, степень очистки препарата – очень высокая. Продукт должен быть очищен от пирогенов, вирусной и бактериальной ДНК
Другие критерии	Цена продукта должна быть приемлемой

* Исключение – наркотические вещества, применяемые при лечении некоторых заболеваний

Ферменты в качестве пищевых добавок

Рекомендации ЖЕСФА (объединенный экспертный комитет по пищевым добавкам при ВОЗ)	
Ферменты из животных и растительных тканей	Нет необходимости в проведении токсикологического исследования
Ферменты из непатогенных микроорганизмов	Проведение нескольких токсикологических тестов
Ферменты из других микроорганизмов	Продолжительное токсикологическое тестирование
Ферменты из патогенных микроорганизмов	Запрещены к применению

Этические аспекты генетической инженерии

ВВЕДЕНИЕ. Стремительное развитие генетической инженерии в последние годы вызвало бурную общественную реакцию, касающуюся перспектив этого развития, а также этические аспекты. К активно обсуждаемым этическим проблемам относятся следующие: 1) изменение генетической информации любого индивидуума (организма); 2) использование генной терапии, в особенности с использованием зародышевых клеток; 3) клонирование эмбрионов человека; 4) терапия с использованием стволовых клеток; 5) генетические манипуляции с лабораторными животными, их клонирование; 6) опасность использования генной инженерии в военных целях. В связи с явными практическими результатами генетическая инженерия принята общественностью, однако дискуссии вокруг некоторых областей ее применения не утихают.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ. Развитие генной диагностики, прежде всего связанные с успешным секвенированием генома человека, позволяют предположить, что в не столь отдаленном будущем предсказание генетических болезней станет обычной процедурой, в частности, при пренатальном исследовании. В связи с этим возникает вопрос о том, как пациент, врач и общество должны распоряжаться полученной информацией. Должен ли плод быть удален, если исследование показало наличие генных дефектов и высок риск возникновения неизлечимой болезни? Разъяснения также требует вопрос о том, в какой мере данные генетического анализа должны быть доступны общественности (например, в случае использования генетического анализа для борьбы с преступностью), страховым компаниям и работодателям (оценка вероятности возникновения заболевания).

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ. Для проведения генной терапии с использованием соматических клеток требуется согласие пациента, поэтому очевидна необходимость подробного разъяснения пациенту всех аспектов лечения, в том числе и рисков. В случае генной терапии зародыша, естественно, изменение его генетического материала осуществляется без его согласия. Многие методы генной терапии успешно применяются на лабораторных животных.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАНИПУЛЯЦИИ. В отличие от генетических манипуляций с микроорганизмами – продуцентами ценных соединений, распространенных и признанных практически повсеместно, использование генетической инженерии в растениеводстве вызывает определенный общественный протест, связанный с опасениями по поводу риска распространения трансгенных растений, а также по поводу их применения в пищу. Создание трансгенных сельскохозяйственных животных критикуется еще больше. При этом противники создания трансгенных живот-

ных, как правило, не делают различия между теми, для которых планируется получить трансгенное животное: для повышения выхода определенного продукта, экспрессии гетерологичного белка или для изучения действия лекарственных препаратов (моделирование наследственных заболеваний).

КЛОНИРОВАНИЕ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА. Появление первых клонированных животных, полностью идентичных донору, – овцы, мыши, свиньи, коровы и козы – вызвало бурное обсуждение этических вопросов, в особенности, в свете очевидной возможности клонирования человека (репродуктивное клонирование). Клонирование человека может иметь неожиданные последствия для общего популяционного равновесия (например, планируемый выбор пола ребенка). Группа исследователей из Кореи в 2004 г. осуществила клонирование эмбриона человека и выделила из него стволовые клетки.

ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. При обсуждении этических аспектов этой технологии прежде всего встает вопрос о том, начиная с какого момента зародыша можно считать членом общества, и, следовательно, у него появляются права, как у всех граждан. В настоящее время активно изучаются возможности использования стволовых клеток взрослого человека для терапии тяжелых заболеваний.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВОЕННЫХ ЦЕЛЯХ. Современные методы биотехнологии позволяют получать большие количества различного биологического материала, который может применяться как биологическое оружие. Примером могут служить споры таких патогенных микроорганизмов, как *Bacillus anthrax*. Сейчас уровень развития генетической инженерии настолько высокий, что можно получать биологически активные вещества, не вызывающие иммунной реакции. Так, интерлейкин-4, ген которого экспрессируется вирусом оспы мышей, полностью нарушает функционирование иммунной системы мыши. Несмотря на запрет на распространение биологического оружия, согласно Женевской конвенции, в некоторых странах его производство до сих пор не прекращено.

ОБЩЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ. Во всех развитых странах использование в медицинских целях препаратов, полученных генно-инженерным путем, принято общественностью и широко распространено. Такая же ситуация наблюдается с генетически модифицированными микроорганизмами, продуцирующими важные для промышленности ферменты. В то же время получение и применение трансгенных животных и растений вызывает бурный протест общественности, особенно если речь идет об их использовании в пищевой промышленности.

Научные и философские аргументы

Запрет

Некоторые поступки человека предосудительны: так, проводя генно-инженерные эксперименты, он пытается выступить в роли Бога. При этом человек разрушает природу.

Прагматический подход

Избавить больных людей от страданий – вот основная цель генетической инженерии. Безусловно, используемый для этого метод должен быть безопасен, и решение об осуществлении генетической диагностики и применении генной терапии должно приниматься пациентом после подробного разъяснения ему всех положительных и отрицательных сторон.

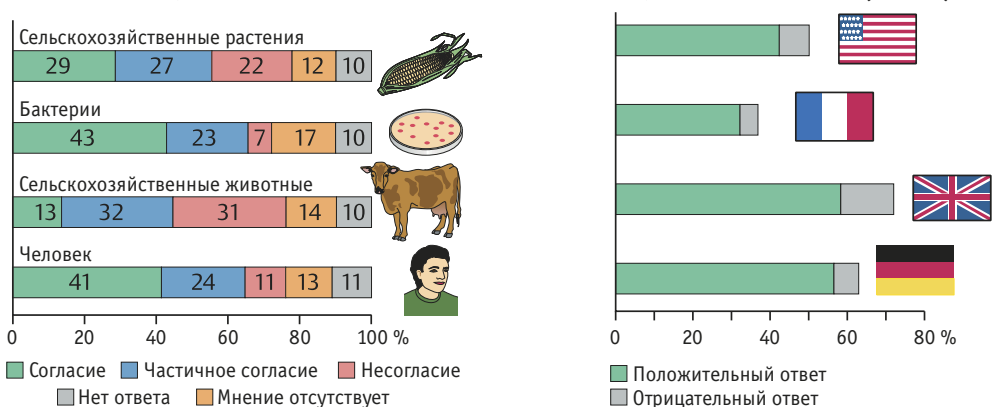
Общественное мнение

Социальные последствия развития генетической инженерии абсолютно непредсказуемы. Медицинские применения методов генной терапии имеют ложные цели: значительно важнее профилактика заболеваний, чем их лечение. Негуманное использование достижений генетической инженерии неизбежно, и это может привести к безответственному отношению к человеческой жизни.

Вопросы, вызывающие наибольший протест общественности

Тема	Состояние развития	Регуляция
Клонирование человека и животных	Успешное клонирование	Запрещено в большинстве государств
Эксперименты с эмбриональными стволовыми клетками	Используется в животноводстве	Разрешено с ограничениями
Искусственное оплодотворение, выбор пола ребенка, использование суррогатной матери	Используется в животноводстве	Искусственное оплодотворение разрешено, выбор пола ребенка запрещен
Пренатальная диагностика	Цитологические методы используются, анализ ДНК – значительно реже	Разрешено, прерывание беременности только по медицинским показаниям
Оценка риска возникновения заболевания на основе генетического анализа	Возможно в случае моногенных заболеваний	Активно обсуждается, достаточно ли наличия генного дефекта для предсказания болезни, и насколько достоверен поставленный диагноз. Необходимо строгое установление сроков прогноза, важных для работодателей и страховых обществ
Трансгенные животные для получения фармакологических продуктов	Используется	Принято, однако обсуждаются аспекты защиты животных
Получение продуктов питания с использованием трансгенных растений и животных	Многие методы уже используются	Обсуждаются аспекты защиты животных, защиты прав потребителей и экологических последствий
Биотехнологическое получение фармакологических продуктов	Используется	Повсеместно принято

Общественная реакция на использование биотехнологии в различных областях (2001 г.)



Патентование в биотехнологии

ВВЕДЕНИЕ. Во всех развитых странах существует система патентования и защиты авторского права на получение различных веществ и разработку новых методов. Наряду с новизной, предлагаемое для патентования вещество или метод должны иметь практическое значение, в частности, в промышленности. Патенты выдаются в случае получения новых веществ или многокомпонентных смесей с важными для промышленного применения качествами. Для патентования метода также необходимо, чтобы он имел практическое приложение. Вещества и методы, представленные на патентование, должны быть получены впервые, и способ их разработки должен представлять собой оригинальную идею, таким образом, нельзя патентовать незначительные модификации уже известных методов или соединений. Не выдаются патенты на научные открытия, не имеющие прикладного значения, банки данных, программное обеспечение, терапевтические и диагностические методы, а также выведенные сорта растений и линии животных*. Открытия, подлежащие патентованию, не должны противоречить общественным представлениям об этике и морали. Патентованию подлежат медикаменты и фармацевтические препараты.

ПРОЦЕДУРА ПАТЕНТОВАНИЯ. Заявка на патент, поступившая от физического или юридического лица в патентное бюро, как правило, через патентного поверенного, анализируется с целью установления оригинальности изобретения и его практической ценности. Если изобретение признано патентоспособным, изобретатель должен представить подробную форму с описанием изобретения в специальную комиссию не позже чем через 6 мес. В случае, если эта документация не подана, через 18 мес. со времени первичной заявки содержащаяся в ней информация может быть обнародована. Если после тщательного рассмотрения патентной комиссией принимается решение о выдаче патента, в течение 9 мес. другие физические или юридические лица могут заявить об аналогичных разработках, и тогда решение комиссии может быть отменено, или патент может быть разделен между несколькими участниками. Первичной заявкой в большинстве стран принято считать заявку, впервые поданную в патентное бюро, а в США «время жизни» изобретения отсчитывают с первого появления записи о нем в лабораторном журнале. Исключительное патентное право сохраняется 20 лет со времени первичной заявки, при этом в некоторых странах даже после присуждения патента возможно изменение статуса открытия, если возникают сомнения в его новизне или оригинальности идеи. Процедура получения патента стоит от 1000 до нескольких десятков тысяч

евро. В соответствии с законодательством Германии изобретения, сделанные сотрудниками компании или государственного учреждения, передаются работодателю, а в течение первых 4 мес. использования патента изобретатель получает определенный процент прибыли.

ПАТЕНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ. Согласно описанным выше критериям, выделенные из живых организмов или полученные биотехнологическими способами вещества являются патентоспособными. Организмы, полученные методами генной инженерии и используемые в сельском хозяйстве, за исключением семян, также подлежат патентованию, например штаммы-продуценты или клеточные линии. При патентовании биотехнологических методов особенно важно, чтобы изобретение было описано достаточно полно. Поэтому при патентовании нового организма необходимо представить этот организм в специальные учреждения, где он будет содержаться и исследоваться экспертами из патентной комиссии (в соответствии с Договором о международном признании и депонировании для целей патентной процедуры, принятым в Будапеште в 1977 г.). Для представления белков или других генных продуктов достаточно указать аминокислотную последовательность или структуру ДНК (если указаны их специфические функции) и указать, каким образом можно получить этот продукт. Мутантные гены и модифицированные в результате изменения генома белки также можно патентовать, если они соответствуют всем критериям, необходимым для получения патента. Расшифрованные последовательности генов или EST (*expressed sequence tags*) не подлежат патентованию, даже если они признаются полезными. Трансгенные животные и растения являются объектами патентования в странах ЕС и США.

ПАТЕНТОВАНИЕ В ЕВРОПЕ. В странах ЕС и некоторых других европейских странах (например, в Швейцарии) национальные законодательства о патентовании унифицированы: исключительные права на изобретение, зарегистрированные в одной из этих стран, сохраняются и на территории других стран.

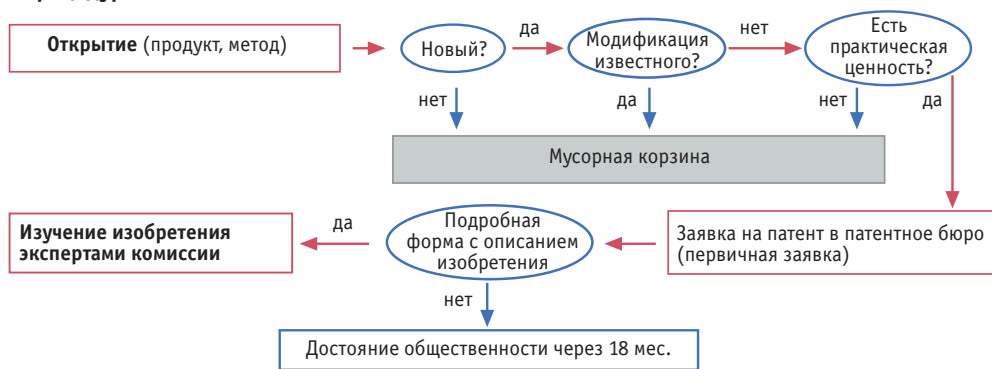
* В России эти категории признаны патентоспособными. — Прим. перев.

Основные категории патентов в биотехнологии

Примеры патентов в биотехнологии

Патенты на продукты		Патенты на методы	
Вещества	Клонированные гены, рекомбинантные белки, моноклональные антитела, плазмиды, промоторы, последовательности кДНК, моновалентные вакцины	Методы получения продуктов	Выделение ДНК, синтез ДНК, конструирование векторов, методы очистки белков
Смеси веществ	Поливалентные вакцины, биоинсектициды, фармацевтические смеси, микроорганизмы, трансгенные растения и животные	Действия и операции	Гибридизация нуклеотидных последовательностей, диагностические разработки, методы ПЦР, анализ мутаций
Устройства	Устройство для импульсного гель-электрофореза, прибор для секвенирования ДНК, устройство для биолистики	Способы использования	Применение биоинсектицидов, использование генетически модифицированных организмов в промышленных целях

Процедура патентования



Патентные организации

США	US Patent Office, Вашингтон	www.uspto.gov/
Европа	Europaisches Patentamt, Мюнхен	www.european-patent-office.org/cn.php
Германия	Deutsches Patent- und Markenamt, Мюнхен	www.dpma.de
Япония	Japan Patent Office, Токио	www.jpo-miti.go.jp/
КНР	State Intellectual Property Office	www.sipo.gov.cn
Международная организация защиты прав на интеллектуальную собственность	World Intellectual Property Organization, Женева	www.wipo.int/portal/index.html.en

Число патентов в области биотехнологии

	Мир		США		Германия		Англия		Франция		Япония		Китай	
	1990	2000	1990	2000	1990	2000	1990	2000	1990	2000	1990	2000	1990	2000
Молекулярная генетика	2 830	15 117	1 275	8 530	225	947	164	847	128	571	636	1 634	3	362
Способы ферментации	3 581	3 288	705	746	408	312	130	116	115	100	1 632	1 219	36	162
Фармацевтика	11 297	23 533	3 341	10 026	1 210	1 926	671	1 244	703	1 060	3 216	4 309	56	692

По материалам сайта «Chemical Abstracts», секция 3: «Биохимическая генетика», 16: «Ферментация и промышленная химия», 63: «Фармацевтика». В случае, когда патентом владеет международная организация, она оставляет за собой право не указывать, в какой стране было сделано запатентованное открытие.

Биотехнология в разных странах

ВВЕДЕНИЕ. Как и в других отраслях науки и техники, успехи биотехнологии являются результатом деятельности ученых разных стран. Часто причиной стремительного развития биотехнологии становились не только революционные изменения научных представлений, но и потребности экономики, например экономические кризисы стимулировали развитие технологии ферментации в Европе и Японии в 70-е гг. XX в. В разработке методов генетической инженерии основной вклад принадлежит США. Начиная с 1976 г. там, а затем и в странах Европы и в Японии, стали возникать мелкие научно-исследовательские фирмы. Они мгновенно нашли собственную нишу на биржах и стали объектом купли–продажи крупных компаний. В 1999 г. в США и Европе насчитывалось около 2000, в Японии – 400 фирм, специализирующихся в области биотехнологии, генетической инженерии и биоинформатики (2004 г.).

США. Первыми биотехнологическими фирмами в США были Cetus (1971), Genex (1972), Genentech (1976), Biogen (1978) и Amgen (1980). Предпосылкой к созданию фирмы, как правило, служила разработка нового перспективного метода, права на который были закреплены патентом. Например, фирма Genentech была создана для разработки метода гетерологичной экспрессии генов – так называемого патента Козна–Бойера. Многим фирмам удалось за несколько лет существования стать собственниками многочисленных патентов. Так, Genentech запатентовала метод генно-инженерного получения человеческого инсулина в клетках *E. coli* (1976), фактора VIII человека (1978) и тканевого активатора плазминогена в культуре животных клеток (1980). Значительный рост прибыли компаний за счет выдачи лицензий на запатентованные технологии обеспечил их успех на бирже. В 1992 г. концерн Roche (Базель) выкупил 70% акций Genentech за 3 млрд долл. США, а позднее стал собственником фирмы Cetus, запатентовавшей метод ПЦР. По сравнению с первичными затратами прибыль биотехнологических фирм пока небольшая. Многие крупные фармацевтические фирмы, такие как Novartis, Roche, Sanofi-Aventis, Glaxo-Smith-Kline, Merck-Sharp & Dohme, Bayer, Monsanto, Dupont и др., активно открывают свои региональные представительства. Такая политика становится очевидной в свете перспектив использования генетического анализа для получения новых биологически активных веществ: в институтах фирм проводится секвенирование и анализ геномов. Многие центры расположены на территории США.

ЕВРОПА. В Европе венчурные фирмы, специализирующиеся на биотехнологии, появились позже, чем в США, однако сейчас насчитывается большое количество мелких компаний, успешно работающих в об-

ласти биотехнологии. Большинство фирм находятся в Великобритании и Германии. В производстве новых фармацевтических препаратов лидирует Великобритания.

ЯПОНИЯ. С приватизацией японских университетов число начинающих предприятий также увеличилось и достигло 400 в 2004 г. (в области биотехнологии и генных технологий). Имеется большое число крупных компаний, специализирующихся в «новой биотехнологии». Некоторые из них, например Suntory и Kirin Beer, прочно завладели отдельными секторами рынка.

ИННОВАЦИИ. Большинство современных инноваций в области биотехнологии и генетической инженерии разработано в странах Европы и в Японии, однако абсолютным лидером являются США. Если в качестве критерия оценки использовать количество публикаций, например, в области молекулярной генетики, ведущая роль США становится очевидной: на долю США приходится более 40% статей.

ГОСУДАРСТВЕННЫЕ ПРОГРАММЫ. В большинстве развитых стран и стран с переходным типом экономики (например, в Китае) биотехнология признана «мегатехнологией» XXI в., и ее развитие активно поддерживается государством. Особое внимание уделяется школьному образованию (преподаванию в школе химии, биологии, основ промышленных технологий, информатики), а также подготовке квалифицированных кадров.

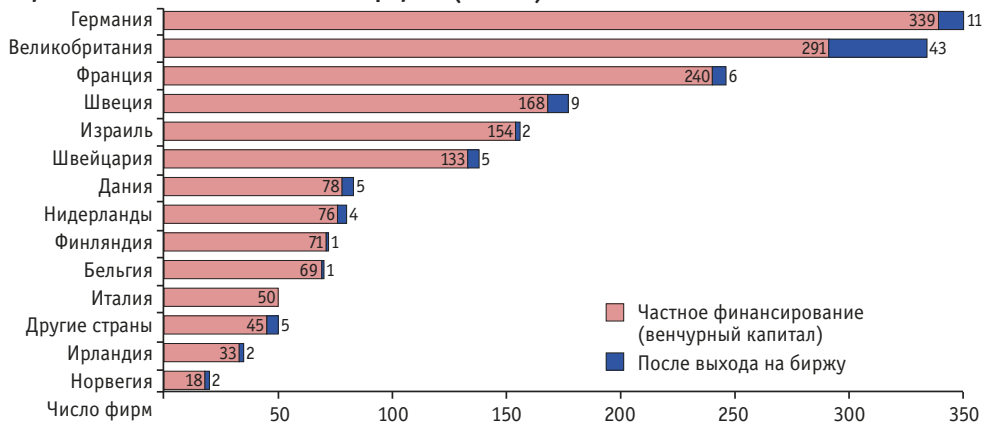
Сравнение количества публикаций в Chemical Abstracts за 2004 г.

	В мире	США	Германия	Англия	Франция	Япония	Китай
Молекулярная генетика	62 251	24 765	4 219	3 771	2 647	6 480	2 529
Ферментация	9 526	87	653	155	141	1 346	1 300
Фармацевтика	37 361	13 558	3 099	2 295	1 730	3 882	1 300

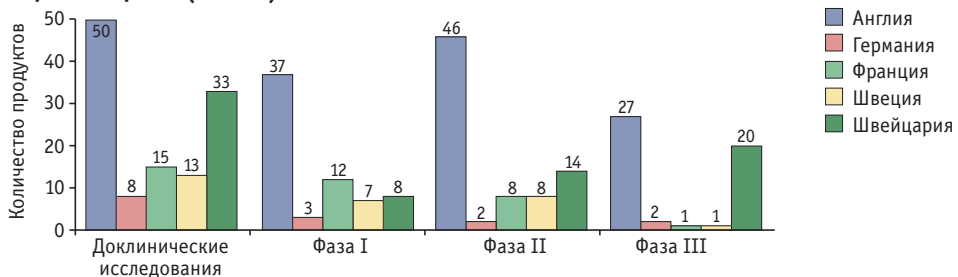
Оценка биотехнологических фирм

	США, долл. США			Европа, евро		
	1999	2000	2003	1999	2000	2003
Количество фирм	1 274	1 379	1 473	1 351	1 570	1 861
Из них фирмы, зарегистрированные на бирже (public companies)	301	339	314	69	105	96
Число служащих (× 1000)	162	174	198	58	61	78
Исследования и разработки, млрд	10,7	14,7	17,9	3,4	5,0	6,3
из них зарегистрировано на бирже	6,9	10,5	13,6	1,7	2,7	4,2
Оборот, млрд	22,3	26,6	39,2	6,3	8,7	11,2
из них зарегистрировано на бирже	18,8	23,4	35,8	2,6	4,4	7,4
Убытки, млрд	5,6	6,2	5,4	1,1	1,6	1,9
из них зарегистрировано на бирже	3,2	4,2	3,2	0,4	0,3	0,5

Европейские биотехнологические фирмы (2003 г.)



Фармацевтическая продукция, находящаяся на стадии испытаний в странах Европы (2003 г.)



Финансирование биотехнологических отраслей, млн долл. США

	США			Европа		
	1999	2000	2003	1999	2000	2003
Биржи	605	6 698	448	319	2 950	—
Другие источники капитала	4 303	23 237	11 131	235	2 447	1 602
Рискованные вложения	1 392	3 207	2 826	579	1 154	1 040
Всего	6 300	33 142	14 405	1 133	6 551	2 642

Литература

При написании этой книги был переработан огромный объем информации из справочников, научных монографий и научных публикаций. Это небольшое издание не позволило подробно цитировать все эти источники.

Поэтому, предполагая, что у читателя появится интерес к дальнейшему изучению, я привожу ниже почти всю литературу, которую я использовал. В начале приведен список справочников и учебников, он дополнен и обновлен при подготовке 2-го издания. Как и в 1-м издании, приведены интернет-ссылки, где можно почерпнуть прекрасный материал. По отдельным темам цитируются прежде всего следующие источники:

Advances in Biochemical Engineering, Springer-Verlag
Biotechnology – A Comprehensive Handbook, 2nd Edition, Wiley-VCH
Biologie in unserer Zeit, Wiley-VCH
Chemie in unserer Zeit, Wiley-VCH
Current Opinions in Biotechnology, Current Biology Publications
Current Opinions in Microbiology, Current Biology Publications
Current Opinions in Structural Biology, Current Biology Publications
Current Opinions in Genetics and Cell Biology, Current Biology Publications
Trends in Biotechnology, Elsevier Publishers
Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5th Edition, Interscience-Wiley
Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Edition, Interscience-Wiley
Nachrichten aus der Chemie, Wiley-VCH
Pharmazie in unserer Zeit, Wiley-VCH
Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed. on-line
Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 4th ed. Wiley-VCH

Общие справочники и учебники

Rompp Online, Thieme Chemistry,
www.roempp.com/thieme-chemistry/roempp/info/index.shtml
HJ Rehm, G Reed, A Puhler, P Stadler, eds. *Biotechnology – A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, 2nd Edition. Wiley-VCH, ISBN 1-56081-602-3
W Deckwer, A Puhler, R Schmid (1999) *Römpp Lexikon Biotechnologie und Gentechnik*, 2. Auflage ed., Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-736402-7
G Eisenbrand, P Schreier (1995) *Römpp Lexikon Lebensmittel-Chemie*, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-736601-1
J Falbe, M Regitz (1996–1999) *Römpp Lexikon der*

Chemie, 10. Auflage, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-107830-8
H Hulpke, H Koch, R Wagner (1993) *Römpp Lexikon Umwelt*, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-736501-5
W Steglich, B Fugmann, S Lang-Fugmann (1997) *Römpp Lexikon Naturstoffe*, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-749901-1
A Puhler, M Regitz, R Schmid (2000) *Römpp Kompakt Lexikon Biochemie und Molekularbiologie*, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-116681-9
B Atkinson, F Maviura (1991) *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, 2nd Edition, Mamillan Publishers, ISBN 1-56159-012-6
K Baumann, T Giessmann, P Grass, A Greinacher, W Holla, M Hunz, O Kayser, G Maldener, G Radtke, W Siegmund, S Weinbrenner, W Weitschies, *Arzneimittel in Chemische Technik, Prozesse und Produkte*, Winnacker-Küchler, 5. Auflage, R Dittmeyer, W Keim, G Kreysa, A Oberholz, Hrsg., Wiley VCH, ISBN 3-527-31032-0
J Black (1999) *Microbiology – Principles and Explorations*, 4th Edition, Prentice Hall, ISBN 0-13-920711-2
T Brown (2002) *Gentechnologie für Einsteiger*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 3-8274-1302-8
T Brown (1999) *Genomes* John Wiley & Sons, ISBN 1-85996-201-7
T Brown (2002) *Genomes 2* Wiley Inter-Science, ISBN 0-471-25046-5
W Crueger, A Crueger (1989) *Biotechnologie – Lehrbuch der Angewandten Mikrobiologie*, 3. Auflage, R Oldenbourg, ISBN 3-486-28403-7
B Dixon (1996) *Power unseen: how Microbes rule the World*, W. H. Freeman, ISBN 0-7167-4550-X
A Demain, J Davies (1999) *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd Edition, ASM Press, ISBN 1-55581-128-0
B Diehl, KH Drauz, A Karau, O May (2004) *Biotechnologie in Chemische Technik, Prozesse und Produkte*, Winnacker-Küchler 5. Auflage, R Dittmeyer, W Keim, G Kreysa, A Oberholz, Hrsg., Wiley VCH, ISBN 3-527-31032-0
T Dingermann (1999) *Gentechnik, Biotechnik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, ISBN 3-8047-1597-4
B Glick, J Pasternak (2003) *Molecular Biotechnology*, 3rd Edition, ASM Press, ISBN 1-555-81224-4
W Hennig (1998) *Genetik*, 2. Auflage ed., Springer-Verlag, ISBN 3-540-63528-9
W Janning, E Knust (2004) *Genetik* Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-128771-3
R Knippers (2001) *Molekulare Genetik* Georg Thieme Verlag, ISBN 3-1347-7008-3
J Lengeler, G Drews, H Schlegel (1999) *Biology of the*

Prokaryotes Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-108411-1

- A Leuchtenberger (1998) *Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie*, BG Teubner, ISBN 3-519-03546-3
- F Lottspeich, H Zorbas (1998) *Bioanalytik* Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 3-8274-0041-4
- S Minol, HG Gassen (2004) *Gentechnologie in Chemische Technik, Prozesse und Produkte*, Winnacker-Küchler, 5. Auflage, R Dittmeyer, W Keim, G Kreysa, A Oberholz, Hrsg., Wiley VCH, ISBN 3-527-31032-0
- P Prave, U Faust, W Sittig, D Sukatsch (1994) *Handbuch der Biotechnologie*, 4. Auflage, R Oldenbourg Verlag, ISBN 3-486-26223-8
- HG Schlegel (1992) *Allgemeine Microbiologie* 7. Auflage ed., Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-444607-3
- HG Schlegel, HW Doelle, A Fiechter, H Yamada, S Shimizu *Biotechnology* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley, ISBN 3-527-31318-4
- HP Schuchmann, H Schuchmann (2004) *Lebensmitteltechnologie und Verfahrenstechnik in Chemische Technik, Prozesse und Produkte*, Winnacker-Küchler 5. Auflage, R Dittmeyer, W Keim, G Kreysa, A Oberholz, Hrsg., Wiley VCH, ISBN 3-527-31032-0
- U Wollenberger, R Renneberg, FF Bier, FW Scheller (2003) *Analytische Biochemie*, Wiley-VCH, ISBN 3-527-30166-6
- G Walsh (2002) *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-89907-0
- J Watson, M Gilman, J Witkowski, M Zoller (1992) *Recombinant DNA*, 2nd Edition, Scientific American Books, ISBN 0-7167-2282-8

Этапы развития биотехнологии 8

- R Ulber, K Soyze (2004) *5000 Jahre Biotechnologie: vom Wein zum Penicillin*, Chemie in unserer Zeit 38, 172
- R Renneberg, J Reich (2004) *Liebling, du hast die Katze geklont – Biotechnologie im Alltag*, Wiley-VCH, ISBN 3-527-31075-4

Алкольные напитки 12

- D Schuller, M Casal (2005) *The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry*, Appl. Microb Biotechnol. 68, 292
- V Singleton, C Butzke (1998) *Wine* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition Supplement, 733, Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52696-7
- JE Bujake (1997) *Distilled Beverage Spirits* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- R Kunkee, H Eschnauer (1996) *Wine* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A28, 269, Wiley-VCH, ISBN 3-527-20128-9
- H Dittrich (1995) *Wine and Brandy* in Biotechnology

2nd Edition, 463, Vol. 9. G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6

www.enobooks.de
www.sake-world.com

Пивоварение 14

- MJ Lewis (2003) *Beer and Brewing* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- S Dequin (2001) *The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts*. Appl Microbiol Biotechnol. 56, 577
- M Linko, A Haikara, A Ritala, M Penttila (1998) *Recent advances in the malting and brewing industry*. J. Biotechnol. 65, 85
- J Russell, G Stewart (1995) *Brewing* in Biotechnology 2nd Edition, 419. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6
www.hopsteiner.com

Ферментация в пищевой промышленности 16

- EJ Smid, D Molenaar, J Hugenholtz, WM de Vos, B Teusink (2005) *Functional ingredient production: application of global metabolic models*. Curr Opin Biotechnol. 16, 190
- M Saarela, G Mogensen, R Fonden, J Matto, T Mattila-Sandholm (2000) *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. J Biotechnol 84, 197
- A Forde, GF Fitzgerald (2000) *Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour*. Curr Opin Biotechnol 11, 484
- DB Archer (2000) *Filamentous fungi as microbial cell factories for food use*. Curr Opin Biotechnol 11, 478
- H Ruttloff, J Proll, A Leuchtenberger (1997) *Lebensmittel-Biotechnologie und Ernährung*, Springer-Verlag, ISBN 3-540-61135-5
- H Fleming, K Kyung, F Breidt (1995) *Vegetable Fermentations* in Biotechnology 2nd Edition, 629. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6
- R Shaver, K Batajoo (1995) *Fermented Feeds and Feed Products* in Biotechnology 2nd Edition, 769. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6
- L Beuchat (1995) *Indigenous Fermented Foods* in Biotechnology 2nd Edition, 505. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6
- N Olson (1995) *Cheese* in Biotechnology 2nd Edition. 353. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6
- HG Gassen (1995) *Gentechnik und Lebensmittel. Biologie in unserer Zeit* 25, 214

Пищевые продукты и молочнокислое брожение 18

- W M de Vos, PA Bron, M Kleerebezem (2004) *Postgenomics of lactic acid bacteria and other food-grade bacteria to discover gut functionality*. Curr Opin Biotechnol. 15, 86

M Teuber (1993) *Lactic Acid Bacteria* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 325. Vol. 1, H Sahm (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Этиловый спирт 20

RJ Bothast, MA Schliche (2005) *Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol Appl Microbiol Biotechnol* 67, 19

JE Logsdon (2004) *Ethanol* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-48494

BS Dien, MA Cotta, TW Jeffries (2003) *Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Appl Microbiol Biotechnol*. 63, 258

MJ Davies (2001) 'Corn-to-car' ethanol production. *Trends Biotechnol* 19, 380

AE Wheals, LC Basso, DM Alves, HV Amorim (1999) *Fuel ethanol after 25 years. Trends Biotechnol* 17, 482

CS Gong, NJ Cao, J Du, GT Tsao (1999) *Ethanol production from renewable resources. Adv Biochem Eng Biotechnol* 65, 207

T Senn, H Pieper (1996) *Ethanol – Classical Methods* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

N Kosaric (1996) *Ethanol – Potential Source of Energy and Chemical Products* in Biotechnology 2nd Edition, 121. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

1-Бутанол, ацетон 22

P Dürre, ed. (2005) *Handbook on Clostridia* Taylor & Francis CRC Press, ISBN 0-8493-1618-9

P Dürre, H Bahl (1996) *Microbial Production of Acetone/Isopropanol* in Biotechnology 2nd Edition, 229. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

P Dürre, R Fischer, A Kuhn, K Lorenz, W Schreiber, B Sturzenhofecker, S Ullmann, K Winzer, U Sauer (1995) *Solventogenic enzymes of Clostridium acetobutylicum: catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. FEMS Microbiol. Rev* 17, 251

Уксусная кислота 24

FS Wagner Jr. (2002) *Acetic Acid* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-48494

A Dinsmoor Webb (1997) *Vinegar* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-48494

H Ebner, S Sellmer, H Follmann (1996) *Acetic Acid* in Biotechnology 2nd Edition, 381. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

H Ebner, H Follmann, S Sellmer (1996) *Vinegar* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A27, 403. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20127-0

H Ebner, H Follmann, S Sellmer (1995) *Vinegar* in Biotechnology 2nd Edition, 579. Vol. 9, G Reed, T Nago-dawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6

Лимонная кислота 26

L Karaffa, CP Kubicek (2003) *Aspergillus niger citric acid accumulation: do we understand this well working black box? Appl Microb Biotechnol* 62, 189

R Lopez-Garcia (2002) *Citric Acid* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-48494-6

M Roehr, C Kubicek, J Kominec (1996) *Citric Acid* in Biotechnology 2nd Edition, 307. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

G Blair, P Staal (1993) *Citric Acid* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 6, 354. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52674-6

Молочная и глюконовая кислоты 28

U Deppenmeier, M Hoffmeister, C Prust (2002) *Biochemistry and biotechnological applications of Clostridium strains. Appl Microbiol Biotechnol*. 60, 233

J Kascak, J Kominec, M Roehr (1996) *Lactic Acid* in Biotechnology 2nd Edition, 293. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

R Datta (1995) *Hydroxycarboxylic Acids* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 13, 1042. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52682-7

S Chahal (1990) *Lactic Acid* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A15, 97. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20115-7

M Roehr, C Kubicek, J Kominec (1996) *Gluconic Acid* in Biotechnology 2nd Edition, 347. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

M Roehr, C Kubicek, J Kominec (1996) *Further Organic Acids* in Biotechnology 2nd Edition, 363. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

Аминокислоты 30

K Araki, T Ozeki (2003) *Amino Acids* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-48494

W Pfefferle, B Mockel, B Bathe, A Marx (2003) *Biotechnological manufacture of lysine. Adv Biochem Eng Biotechnol*. 79, 59

KH Drauz, B Hoppe, A Kleemann, HP Krimmer, W Leuchtenberger, C Weckbecker (2002) *Amino acids*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4

M Kircher, W Leuchtenberger (1998) *Aminosäuren – ein Beitrag zur Welternährung. Biologie in unserer Zeit* 28, 281

W Leuchtenberger (1996) *Amino Acids – Technical Production and Use* in Biotechnology 2nd Edition, 465. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

N Esaki, S Nakamori, T Kurhara, S Furuyoshi, K Soda (1996) *Enzymology of Amino Acid Production* in Biotechnology 2nd Edition, 503. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

L-Глутаминовая кислота 32

I Kusumoto (2001) *Industrial production of L-glutamine*. J Nutr. 131, 2552 S

T Kawakita (2000) *L-Monosodium Glutamate(MSG)* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

Получение L-аминокислот путем ферментативной трансформации 38

J Altenbuchner, M Siemann-Herzberg, C Syldatk (2001) *Hydantoines and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids*. *Curr Opin Biotechnol.* 12, 559

A Bommarius, M Schwarm, K Drauz (2001) *Comparison of Different Chemoenzymatic Process Routes to Enantiomerically Pure Amino Acids*. *Chimia* 55, 50

H Griengl, H Schwab, M Fechter (2000) *The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases*. *Trends Biotechnol* 38, 252

Антибиотики: источники, применение и механизмы действия 34

D Borders (2000) *Antibiotics, Survey* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

U Gräfe (1992) *Biochemie der Antibiotika – Struktur – Biosynthese – Wirkmechanismus*, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 3-86025-002-7

D Borders (1992) *Antibiotics, Survey* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 2, 893. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52669-X

G Cauwenbergh (1992) *Antiparasitic Agents, Antimycotics* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, 473. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1

Антибиотики: получение.

Устойчивость к антибиотикам 42

LR Peterson (2005) *Squeezing the antibiotic balloon: the impact of antimicrobial classes on emerging resistance*, Clin Microbiol Infect. 11 Suppl 5, 4

OA Mascaretti (2003) *Bacteria versus Antibacterial Agents – an integrated approach*, ASM Press, ISBN 1-55581-258-9

D Golemi-Kotra, S Mobashery (2002) *Antibiotic Resistance* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

K Chater, M Bibb (1997) *Regulation of Bacterial Antibiotic Production* in Biotechnology 2nd Edition, 57. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2

Hv Döhren, U Gräfe (1997) *General Aspects of Secondary Metabolism* in Biotechnology 2nd Edition, 1. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2

β-Лактамные антибиотики: структура, биосинтез и механизм действия 44

AA Brakhage (ed) (2004) *Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases* Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology Vol. 88 / 2004 Springer, ISBN 3-540-22032-1

J Roberts (2000) *Cephalosporins* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

K Lindner, D Bonner, W Koster (1992) *Monobactams* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, 107. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1

J Roberts (1992) *Cephalosporins* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, 28. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1

R Southgate, N Osborne (1992) *Carbapenems and Penems* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, 1. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1

β-Лактамные антибиотики: промышленное получение 46

MS Barber, U Giesecke, A Reichert, W Minas (2004) *Industrial enzymatic production of cephalosporin-based beta-lactams*, Adv Biochem Eng Biotechnol 88, 179

TR Barends, H Yoshida, BW Dijkstra (2004) *Three-dimensional structures of enzymes useful for beta-lactam antibiotic production*. *Curr Opin Biotechnol.* 15, 356

CF Sio, WJ Quax (2004) *Improved beta-lactam acylases and their use as industrial biocatalysts*, Curr Opin Biotechnol. 15, 349

MA Penalva, RT Rowlands, G Turner (1998) *The optimization of penicillin biosynthesis in fungi*. *Trends Biotechnol* 16, 483

J Nosek, R Radzio, U Kück (1997) *Produktion von Lactamantibiotika durch Mikroorganismen*. *Chem. unserer Zeit* 31, 172

P Skatrud, T Schwewecke, Hv Liempt, M Tobin (1997) *Advances in the Molecular Genetics of β-Lactam Antibiotic Biosynthesis* in Biotechnology 2nd Edition, 247. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2

Пептидные антибиотики и антибиотики – производные аминокислот 48

T Dürfahrt, MA Marahiel (2005) *Peptidantibiotika vom molekularen Fließband*, *Nachr. aus der Chemie* 53, 507
A Mor (2001) *Antimicrobial Peptides* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

H Kleinkauf, Hv Döhren (1997) *Peptide Antibiotics in Biotechnology 2nd Edition*, 277. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2

Гликопептидные, полиэфирные и нуклеозидные антибиотики 50

RD Süßmuth, W Wohlleben (2004) *The biosynthesis of glycopeptide antibiotics – a model for complex, non-ribosomally synthesized, peptidic secondary metabolites Appl Microb Biotechnol* 63, 344

RD Süßmuth (2003) *Glycopeptidantibiotika und bakterielle Resistenz Nachr. aus der Chemie* 51, 1247

FJ Antosz (2000) *Ansamacrolides in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

DL Klayman (2000) *Antiparasitic Agents, Antiprotozoals in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

J Kallen, V Mikol, V Quesniaux, M Walkinshaw, E Schneider-Scherzer, K Schörgendorfer, G Weber, H Fliri (1997) *Cyclosporins: Recent Developments in Biosynthesis, Pharmacology and Biology, and Clinical Applications in Biotechnology 2nd Edition*, 535. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2

Аминогликозидные антибиотики 52

D McGregor (2000) *Aminoglycosides in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

W Piepersberg, J Distler (1997) *Aminoglycosides and Sugar Components in Other Secondary Metabolites in Biotechnology 2nd Edition*, 397. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2

Тетрациклины, хиноны, хинолоны

и другие ароматические антибиотики 54

JF Kadow, JF Barrett, D Beaulieu, TJ Dougherty, NA Meanwell, KA Ohemeng-Paratek, B Ryan (2002) *Antibacterial Agents, Quinolones in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

U Petersen (2001) *Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation: Die Evolution der Chinolone. Pharmazie in unserer Zeit* 30, 376

TW Doyle, DM Vyas (2000) *Anticancer Chemotherapeutics in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

U Gräfe, K Dornberger, H Salz (1997) *Biotechnical Drugs as Antitumor Agents in Biotechnology 2nd Edition*, 641. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2

J Hlavka, G Ellestad, I Chopra (1992) *Tetracyclines in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition* 3, 331. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1

T Nagabhushan, G Miller, K Varma (1992) *Chloramphenicol and Analogues in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition* 2, 961. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52669-X

Поликетидные антибиотики 56

E Fjaervik, SB Zotchev (2005) *Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in Streptomyces noursei. Appl Microbiol Biotechnol.* 67, 436

H Kirst (2001) *Antibiotics, Macrolides in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

G Cauwenbergh (2000) *Antiparasitic Agents, Antimycotics in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

Получение новых антибиотиков 58

DA Hopwood (2003) *Streptomyces genes: from Waksman to Sanger. J Ind Microbiol Biotechnol.* 30, 468

J Staunton, B Wilkinson (2001) *Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides. Curr Opin Chem Biol.* 5, 159

R Gokhale, D Tuteja (2001) *Biochemistry of Polyketide Synthases in Biotechnology 2nd Edition*, 341. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X

M Chartrain, PM Salmon, DK Robinson, BC Buckland (2000) *Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. Curr Opin Biotechnol* 11, 209

Витамины 60

M Eggersdorfer, G Adam, M John, W Hahnlein, L Labler, KU Baldenius, L von dem Bussche-Hünnefeld, E Hilgemann, P Hoppe, R Stürmer, F Weber, A Rüttimann, G Moine, HP Hohmann, R Kurth, J Paust, W Hähnlein, H Pauling, BJ Weimann, B Kaesler, B Oster, U Fechtel, K Kaiser, B de Potzolli, M Casutt, T Koppe, M Schwarz, BJ Weimann, U Hengartner, A de Saizieu, C Wehrli, R Blum (2002) *Vitamins in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed., Interscience-Wiley, ISBN 3-527-31318-4

S Shimizu (2001) *Vitamins and Related Compounds: Microbial Production in Biotechnology 2nd Edition*, 319. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X

V Kuellmer (2001) *Ascorbic Acid in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition* 25, 17. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52694-0

V Kuellmer (2001) *Ascorbic Acid in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

J Scott (1998) *Vitamins, Survey in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition* 25, 1. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52694-0

- F Yoneda (1998) *Riboflavin (B2)* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 25, 132. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52694-0
- J Scott (1998) *Vitamin B12* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 25, 193. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52694-0

Нуклеозиды и нуклеотиды 62

- A Kuninaka (1996) *Nucleotides and Related Compounds* in Biotechnology 2nd Edition, 561. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1
- R Suhadolnik, N Reichenbach (1992) *Nucleosides and Nucleotides* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, 214. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1

Биодетергенты и биокосметика 64

- CN Mulligan (2005) *Environmental applications for biosurfactants*. *Environ Pollut.* 133, 183
- EZ Ron, E Rosenberg (2002) *Biosurfactants and oil bioremediation*. *Curr Opin Biotechnol.* 13, 249
- N Kosaric (1996) *Biosurfactants* in Biotechnology 2nd Edition, 659. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

Микробные полисахариды 66

- BF Cong, LM Blan, R McLaughlin, LK Nielsen (2005) *Microbial hyaluronic acid production*. *Appl Microb Biotechnol* 66, 341
- JN BeMiller (2005) *Gums* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- R van Kranenburg, IC Boels, M Kleerebezem, WM de Vos (1999) *Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 498
- I Sutherland (1998) *Novel and established applications of microbial polysaccharides*. *TIB-Tech* 16, 41
- I Sutherland (1996) *Extracellular Polysaccharides* in Biotechnology 2nd Edition, 613. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1

Биоматериалы 68

- CE Nakamura, GM Whited (2003) *Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol*. *Curr Opin Biotechnol.* 14, 454
- A Steinbüchel, S Hein (2001) *Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 71, 81
- RJ Müller (2000) *Biologisch abbaubare Kunststoffe*. *Biologie in unserer Zeit* 30, 218
- MB Hinman, JA Jones, RV Lewis (2000) *Synthetic spider silk: a modular fiber*. *Trends Biotechnol* 18, 374
- IY GalaeV, B Mattiasson (1999) *„Smart“ polymers and what they could do in biotechnology and medicine*. *Trends Biotechnol* 17, 335

- D Oesterhelt (1998) *The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea*. *Curr. Opin. in Struct. Biology* 8, 489
- H Heslot (1998) *Artificial fibrous proteins: a review*. *Biochimie* 80, 19
- G BrauneGG, G Lefebvre, KF Genser (1998) *Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects*. *J Biotechnol* 65, 127
- S Fahnestock, L Bedzyk (1997) *Production of synthetic spider dragline silk protein in Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 47, 33
- A Steinbüchel (1996) *PHB and Other Polyhydroxyalkanoic Acids* in Biotechnology 2nd Edition, 403. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1
- A Salerno, I Goldberg (1993) *Cloning, expression and characterization of a synthetic analog to the bioadhesive precursor protein of the sea mussel Mytilus edulis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 39, 221
- www.cargill.com/news/news_.releases/050201_natureworks.htm
- www.biopolymer.net/
- www.nexiabioitech.com/en/00_home/index.php
- www.cheng.cam.ac.uk/research/groups/biosci/sk_research.html
- www.fourmilab.ch/autofile/www/section2_84_18.html

Биотрансформация 70

- K Faber (2004) *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th Edition ed., Springer-Verlag, ISBN 3-540-78097-1
- AS Bommarius, BR Riebel (2004) *Biocatalysis – Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, ISBN 3-527-30344-8
- JE Prenosil, ÖM Kut, IJ Dunn, E Heinzle (2002) *Immobilized Biocatalysts* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4
- J Schrader, R Berger (2001) *Biotechnological Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds* in Biotechnology 2nd Edition, 373. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X
- U Bornscheuer (2000) *Industrial Biotransformations* in Biotechnology 2nd Edition, 277. Vol. 8b, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28324-2
- K Faber, R Patel (2000) *Chemical biotechnology. A happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry*. *Curr Opin Biotechnol* 11, 517
- A Liese, K Seelbach, C Wandrey (2000) *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, ISBN 3-527-30094-5
- J Rabenhorst (2000) *Biotechnological Production of Natural Aroma Chemicals by Fermentation Processes* in Biotechnology 2nd Edition, 333. Vol. 8b, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28324-2

- B Schulze, MG Wubbolts (1999) *Biocatalysis for industrial production of fine chemicals*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 609
- D Kelly (1999) *Biotransformations – Practical Aspects* in *Biotechnology* 2nd Edition, 25. *Vol. 8a*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6
- M Turner (1997) *Perspectives in Biotransformation* in *Biotechnology* 2nd Edition, 5. *Vol. 8a*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28318-8
- S Shimizu, J Ogawa, M Kataoka, M Kobayashi (1997) *Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58, 45
- M Turner (1999) *Biotransformations – Practical Aspects* in *Biotechnology* 2nd Edition, 25. *Vol. 8a*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6
- O Sebek, J Rosazza (1995) *Microbial Transformations* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 16, 611. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52685-1

Биотрансформация стероидов 72

- FM Szczebara, C Chandelier, C Villeret, A Masurel, S Bourrot, C Dupont, S Blanchard, A Groisillier, E Testet, P Costaglioli, G Cauet, E Degryse, D Balvuenza, J Winter, T Achstetter, R Spagnoli, D Pompon, B Dumas (2003) *Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast*. *Nature Biotechnology* 21, 143
- BP Morgan, MS Moynihan (1997) *Steroids* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- R Müller (1994) *Steroids* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A25, 309. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20125-4

Ферменты 74

- KM Kragh, J Frisback Sorensen, C Grassin, M Herweijer, J Wilms, A de Roos, JB Soe, I Herbots, B Kottwitz, PJ Reilly, RL Antrim, H Burrows, HBM Lenting, L Viikari, A Suurnäkki, ML Niku-Paavola, J Buchert, KH Maurer, A Saettler, H Waldmann, C Schultz, H Gröger, C Dinkel, KH Drauz, GB Kresse, R Schmuck, K Wulff, G Henniger, C Kessler, AJ Caddow, B Concoby (2002) *Enzymes* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley, ISBN 3-527-31318-4
- S Miot, J Boulay (2001) *Protein technologies and commercial enzymes*. *Curr Opin Biotechnol* 12, 329
- A Curtis (2000) *Carbon-Carbon Bond Formation Using Enzymes* in *Biotechnology* 2nd Edition, 5. *Vol. 8b*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28324-2
- S Flitsch, G Watt (2000) *Enzymes in Carbohydrate Chemistry: Formation of Glycosidic Linkages* in *Biotechnology* 2nd Edition, 243. *Vol. 8b*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28324-2
- D Kelly, J Mahdi (2000) *Lyases* in *Biotechnology* 2nd Edition, 41. *Vol. 8b*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28324-2

- G Robinson, S Jackman, J Stratford (2000) *Halocompounds* in *Biotechnology* 2nd Edition, 173. *Vol. 8b*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28324-2
- H Holland (1999) *Hydroxylation and Dihydroxylation* in *Biotechnology* 2nd Edition, 475. *Vol. 8a*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6
- D Hoople (1999) *Cleavage and Formation of Amide Bonds* in *Biotechnology* 2nd Edition, 243. *Vol. 8a*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6
- R Scopes (1994) *Protein Purification – Principles and Practice*, 3d Edition ed., Springer-Verlag, ISBN 0-387-94072-3
www.brenda.uni-koeln.de/

Ферментативный катализ 76

- UT Bornscheuer, RJ Kazlauskas (2005) *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, ISBN 3-527-31029-0
- A Schmid, JS Dordick, B Hauer, A Kiene, M Wubbolts, B Witholt (2001) *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. *Nature*. 409, 258
- J McGregor-Jones (2000) *Synthetic Applications of Enzyme-Catalyzed Reactions* in *Biotechnology* 2nd Edition, 351. *Vol. 8b*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28324-2
- A Bunch (1999) *Nitriles* in *Biotechnology* 2nd Edition, 277. *Vol. 8a*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6
- R Kazlauskas, U Bornscheuer (1999) *Biotransformations with Lipases* in *Biotechnology* 2nd Edition, 37. *Vol. 8a*, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6
- D Witiak, A Hopper (1996) *Chiral Pharmaceuticals* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 18, 511. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52687-8
- A Zaks (1994) *Enzymes in Organic Synthesis* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 9, 672. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52677-0

Ферменты в клинических анализах 78

- A Usmani (1995) *Medical Diagnostic Reagents* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 16, 88. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52685-1
- G Kresse (1995) *Analytical Use of Enzymes* in *Biotechnology* 2nd Edition, 137. *Vol. 9*, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6
- E Kopetzki, K Lehnert, P Buckel (1994) *Enzymes in diagnostics: achievements and possibilities of recombinant DNAs technology*. *Clin Chem* 40, 688

Тесты с помощью ферментов 80

- AM Usmani (2000) *Medical Diagnostic Reagents* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

P Gherson, H Lanza, M Elavin, D Vlastelica (1992) *Automated Instrumentation, Clinical Chemistry* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, 751. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1

Применение ферментов

в промышленных технологиях 82

O Kirk, T Damhus, TV Borchert, CC Fuglsang, H Olsen, TT Hansen, H Lund, HE Schiff, L Kierstein Nielsen (2004) *Industrial Enzyme Applications* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

W Aehle, O Misset (1999) *Enzymes for Industrial Applications* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 189. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3

H Uhlig (1998) *Industrial Enzymes and their Applications*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-19660-6

H Olsen (1995) *Use of Enzymes in Food Processing* in Biotechnology 2nd Edition, 663. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6

H Uhlig (1991) *Enzyme arbeiten für uns* Carl Hanser, ISBN 3-446-15702-6

Ферменты в производстве моющих средств 84

KH Maurer (2004) *Detergent proteases. Curr Opin Biotechnol* 15, 330

JHv Ee, O Misset, EJ Baas (1997) *Enzymes in Detergency* in Surfactant Science Series Vol. 69, MJ Schick, FM Fowkes (ed.), Marcel Dekker, Inc., ISBN 0-8247-9995-X

J Lynn (1993) *Detergency* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 7, 1072. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52675-4

Ферменты, расщепляющие крахмал 86

QS Qi, W Zimmermann (2005) *Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications Appl Microb Biotechnol* 66, 475

H Buschmann, D Knittel, K Beermann, E Schollmeyer (2001) *Cyclodextrine und Textilien. Nachr. aus der Chemie* 620

RL Whistler, JR Daniel (2000) *Starch* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

R Whistler, J Daniel (1997) *Starch* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 22, 699. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52691-6

R Daniel, R Whistler, A Voragen, W Pilnik (1994) *Starch and Other Polysaccharides* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A25, 1. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20125-1

www.starch.dk

Ферментативное превращение сахаров 90

RE Hebeda (2000) *Syrups* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

R Hebeda (1997) *Syrups* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 23, 582. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52692-4

T Lee (1997) *Sweeteners* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 23, 556. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52692-4

R Hebeda (1995) *Carbohydrate-Based Sweeteners* in Biotechnology 2nd Edition, 737. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6

WR Lipinski (1995) *Sweeteners* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A26, 23. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20126-2

www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/hfcs.htm

Утилизация целлюлозы и полиозы 92

MTM Polizelli, ACS Rizzatti, R Monti, HF Terenzi, JA Jorge, DS Amorim (2005) *Xylanases from fungi: properties and industrial applications Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577

NS Thompson (2000) *Hemtcellulose* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

N Thompson (1995) *Hemicellulose* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 13, 54. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52682-7

Использование ферментов в целлюлозно-бумажной промышленности 94

W Boerjan (2005) *Biotechnology and the domestication of forest trees. Curr Opin Biotechnol.* 16, 159

C Mai, U Kües, H Militz (2004) *Biotechnology in the wood industry Appl Microb Biotechnol* 63, 477

L Viikari, M Tenkanen, A Suurnäkki (2001) *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* in Biotechnology 2nd Edition, 523. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X

A Gutierrez, JC del Rio, MJ Martinez, AT Martinez (2001) *The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. Trends Biotechnol* 19, 340

A Breen, FL Singleton (1999) *Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. Curr Opin Biotechnol* 10, 252

JF Dean, PR LaFayette, KE Eriksson, SA Merkle (1997) *Forest tree biotechnology. Adv Biochem Eng Biotechnol* 57, 1

A Suurnäkki, M Tenkanen, J Buchert, L Viikari (1997) *Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. Adv Biochem Eng Biotechnol* 57, 261

J Genco (1996) *Pulp* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 20, 493. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52689-4

M Lyne (1996) *Paper* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 18, 1. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52687-8

www.fao.org: Global forest products consumption, production, trade and prices: global forest products model projections to 2010

Пектиназы 96

J Baird (1994) *Gums* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 12, 842. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52681-9

Ферменты в производстве молочных продуктов 98

CW Hall (2000) *Milk and Milk Products* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

J Stein, K Imhof (1990) *Milk and Dairy Products* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A16, 589. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20116-5

dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/
www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs560/topic1/t1_g/t1_g.htm

Использование ферментов в хлебобулочной и мясоперерабатывающей промышленности 100

S Feil (2005) *Lebensmittelchemie Dunkel-braune Brotkruste – krosses Geschmackser-lebnis Oder gesundheitsschadlich?* Chemie in unserer Zeit 39, 88

G Spicher, J Brümmer (1995) *Baked Goods* in Biotechnology 2nd Edition, 241. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6

Ферменты в кожевенной и текстильной промышленности 102

P Hamlyn (1995) *The Impact of Biotechnology on the Textile Industry*. Textiles Magazine 3, 6

E Heideman (1990) *Leather* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A15, 259. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20115-7

Перспективы получения ферментов для промышленных технологий 104

KA Powell, SW Ramer, SBd Cardayré, WP Stemmer, PF Longchamp, GW Huismann (2001) *Gerichtete Evolution und Biokatalyse*. Angew. Chem. 113, 4068

MT Reetz (2001) *Kombinatorische und evolutionsgesteuerte Methoden zur Bildung enantioselektiver Katalysatoren*. Angew. Chem. 113, 322

FH Arnold, JC Moore (1997) *Optimizing industrial enzymes by directed evolution*. Adv Biochem Eng Biotechnol 58, 1

Белковая инженерия 106

RA Chica, N Doucet, JN Pelletier (2005) *Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combi-*

ning the benefits of directed evolution and rational design. Curr Opin Biotechnol. 16, 378

KE Jaeger, T Eggert (2004) *Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution*. Curr Opin Biotechnol. 15, 305

R Daniel (2004) *The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products*. Curr Opin Biotechnol. 15, 199

U Heinemann, G Illing, H Oschkinat (2001) *High-throughput three-dimensional protein structure determination*. Curr Opin Biotechnol. 12, 348

G Klebe (2001) *Wirkstoffdesign bei der Entwicklung substratahnlicher HTV-Protease-Hemmstoffe: Molecular Modelling*. Pharmazie in unserer Zeit 30, 194

A Duschl, M Dreyer, W Sebald (2000) *Ein Designerprotein eröffnet neue Wege zur Asthmatherapie*. Nachr. aus der Chemie 761

Barnickel (1995) *Molecular Modelling – von der Theorie zur Wirklichkeit*. Chem. unserer Zeit 29, 176

S Brakmann, U Kelling, F Oehlenschläger (1995) *Auf der ewigen Suche nach dem Besseren: Die „Evolutive Biotechnologie“ und ihre Perspektive*. Biologie in unserer Zeit 35, 355

Пекарские и кормовые дрожжи 108

AK Athanasios (2002) *Yeasts* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley, ISBN 3-527-31318-1

C Caron (1995) *Commercial Production of Baker's Yeast and Wine Yeast* in Biotechnology 2nd Edition, 321. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6

Белки и жиры из одноклеточных организмов 110

W Babel, HD Pöhland, K Soyez (2002) *Single Cell Proteins* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4

C Ratledge (1997) *Microbial Lipids* in Biotechnology 2nd Edition, 133. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2

N Scrimshaw, E Murray (1995) *Nutritional Value and Safety of „Single Cell Protein“* in Biotechnology 2nd Edition, 221. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28319-6

J Litchfield (1994) *Nonconventional Foods* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 11, 871. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52680-0

Биотехнология и окружающая среда

P Nisipeanu (1999) *Laws, Statutory Orders and Directives on Waste and Wastewater Treatment* in Biotechnology 2nd Edition, 141. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8

T Raphael (1996) *Umweltbiotechnologie*, Springer-Verlag, ISBN 3-540-61423-0

Аэробная очистка сточных вод 112

- C Gallert, J Winter (2000) *Perspectives of Waste, Wastewater, Off-Gas, and Drinking Water Management in Biotechnology* 2nd Edition, 479. Vol. 11c, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28336-6
- W Fritsche, M Hofrichter (2000) *Aerobic Degradation by Microorganisms in Biotechnology* 2nd Edition, 145. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- L Hartmann (1999) *Historical Development of Wastewater Treatment Processes in Biotechnology* 2nd Edition, 5. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- C Gallert, J Winter (1999) *Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment in Biotechnology* 2nd Edition, 17. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- R Kayser (1999) *Activated Sludge Process in Biotechnology* 2nd Edition, 253. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- P Baumann, B Dorias (1999) *Trickling Filter Systems in Biotechnology* 2nd Edition, 335. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- P Koppe, A Stozek, V Neitzel (1999) *Municipal Wastewater and Sewage Sludge in Biotechnology* 2nd Edition, 161. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- K Rosenwinkel, U Austermann-Haun, H Meyer (1999) *Industrial Wastewater Sources and Treatment Strategies in Biotechnology* 2nd Edition, 191. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- P Weiland (1999) *Agricultural Waste and Wastewater Sources and Management in Biotechnology* 2nd Edition, 217. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- H Kroiss, K Svardal (1999) *CSTR-Reactors and Contact Processes in Industrial Wastewater Treatment in Biotechnology* 2nd Edition, 479. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- H Jordening, K Buchholz (1999) *Fixed Film Stationary Bed and Fluidized Bed Reactors in Biotechnology* 2nd Edition, 493. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- A Schramm, R Amann (1999) *Nucleic Acid-Based Techniques for Analyzing the Diversity, Structure, and Dynamics of Microbial Communities in Wastewater Treatment in Biotechnology* 2nd Edition, 85. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8

Анаэробная очистка сточных вод и переработка ила 114

- Y Sekiguchi, Y Kamagata, H Harada (2001) *Recent advances in methane fermentation technology. Curr Opin Biotechnol* 12, 277
- B Schink (2000) *Principles of Anaerobic Degradation of Organic Compounds in Biotechnology* 2nd Edition, 169. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4

- M McInerney (1999) *Anaerobic Metabolism and its Regulation in Biotechnology* 2nd Edition, 455. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- S Phythian (1999) *Esterases in Biotechnology* 2nd Edition, 193. Vol. 8a, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6
- H Märkl (1999) *Modeling of Biogas Reactors in Biotechnology* 2nd Edition, 527. Vol. 11a, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28321-8
- D Schürbüscher, C Wandrey (1993) *Anaerobic Waste Water Process Models in Biotechnology* Second, Completely Revised Edition, 441. Vol. 4, K Schügerl (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28314-5
www.biogas.org/

Биологическая очистка газовых выбросов 116

- RL Berglund (2004) *Industrial Emission Control*, in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- K Engesser, T Plaggemeier (2000) *Microbiological Aspects of Biological Waste Gas Purification in Biotechnology* 2nd Edition, 275. Vol. 11c, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28336-6
- K Fischer (2000) *Biofilters in Biotechnology* 2nd Edition, 321. Vol. 11c, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28336-6
- D Chitwood, J Deviny (2000) *Commercial Applications of Biological Waste Gas Purification in Biotechnology* 2nd Edition, 357. Vol. 11c, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28336-6
- T Plaggemeier, O Lämmerzahl (2000) *Treatment of Waste Gas Pollutants in Trickling Filters in Biotechnology* 2nd Edition, 333. Vol. 11c, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28336-6
- M Reiser (2000) *Waste Gas Treatment: Membrane Processes and Alternative Techniques in Biotechnology* 2nd Edition, 345. Vol. 11c, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28336-6
- E Schippert, H Chmiel (2000) *Bioscrubbers in Biotechnology* 2nd Edition, 305. Vol. 11c, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28336-6
- M Waweru, V Herrygers, HV Langenhove, W Verstraete (2000) *Process Engineering of Biological Waste Gas Purification in Biotechnology* 2nd Edition, 259. Vol. 11c, J Winter (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28336-6

Биологическая очистка почв 118

- KM Scow, KA Hicks (2005) *Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. Curr Opin Biotechnol.* 16, 246
- W Ulrici (2000) *Contaminated Soil Areas, Different Countries and Contaminants, Monitoring of Contaminants in Biotechnology* 2nd Edition, 5. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- J Klein (2000) *Possibilities, Limits, and Future Developments of Soil Bioremediation in Biotechnology* 2nd Edition

- tion, 465. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- RC Prince (2000) *Bioremediation* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- M Koning, K Hupe, R Stegmann (2000) *Thermal Processes, Scrubbing/Extraction, Bioremediation and Disposal* in Biotechnology 2nd Edition, 305. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- T Held, H Dörr (2000) *In situ Remediation* in Biotechnology 2nd Edition, 349. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- R Unterman, M DeFlaun, RJ Steffan (2000) *Advanced in situ Bioremediation – A Hierarchy of Technology Choices* in Biotechnology 2nd Edition, 399. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- C Wischnak, R Müller (2000) *Degradation of Chlorinated Compounds* in Biotechnology 2nd Edition, 241. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- V Schulz-Berendt (2000) *Bioremediation with Heap Technique* in Biotechnology 2nd Edition, 319. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- K Blotevogel, T Gorontzy (2000) *Microbial Degradation of Compounds with Nitro Functions* in Biotechnology 2nd Edition, 273. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- M Kastner (2000) „Humification“ *Process or Formation of Refractory Soil Organic Matter* in Biotechnology 2nd Edition, 89. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- F-M Menn, J Easter, G Saylori (2000) *Genetically Engineered Microorganisms and Bioremediation* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4
- W Chen, F Bruhlmann, RD Richins, A Mulchandani (1999) *Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. Curr Opin Biotechnol* 10, 137
- R Prince (1998) *Bioremediation* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition Supplement, 48. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52696-7
- G Gadd (2001) *Accumulation and Transformation of Metals by Microorganisms* in Biotechnology 2nd Edition, 225. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X
- W Sand (2001) *Microbial Corrosion and its Inhibition* in Biotechnology 2nd Edition, 265. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X
- H Ehrlich (1997) *Microbes and metals. Appl Microbiol Biotechnol* 48, 687

Биотехнология в медицине

- A Skerra (2004) *Neue Biopharmazeutika durch Manipulation pharmakologischer Parameter Nachr. aus der Chemie* 52, 682
- I Zündorf, T Dingermann (2000) *Neue gentechnisch hergestellte Arzneimittel. Pharmazie in unserer Zeit* 29, 167
- P Buckel (1998) *Toward a new natural medicine. Naturwissenschaften* 8, 155
- P Buckel (1996) *Recombinant proteins for therapy. Trends Pharmacol. Sci* 17, 450

Инсулин 122

- G Walsh (2005) *Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. Appl Microbiol Biotechnol* 67, 151
- H Glombik, G Seipke (2001) *Diabetes mellitus – neue Antidiabetika. Nachr. aus der Chemie* 1028
- P Dilg (2001) *Zure Frühgeschichte der industriellen Insulin-Herstellung im 20. Jahrhundert. Pharmazie in unserer Zeit* 30, 10
- T Forst (2001) *Schnell wirkende Insulinanaloge: Neue Wirkstoffe für die Diabetes-Therapie. Pharmazie in unserer Zeit* 30, 118
- I Zündorf, T Dingermann (2001) *Vom Kinder-, Schweine-, Pferde-Insulin zum Human-Insulin: Bereitstellung ausreichender Mengen. Pharmazie in unserer Zeit* 30, 27
- SE Shoelson (2000) *Insulin and Other Antidiabetic Agents* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- S Shoelson (1995) *Insulin and Other Antidiabetic Agents* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 14, 662. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52683-5
- F Schmidt (1985) *Antidiabetic Drugs* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A3, 1. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20103-3

Гормон роста и другие гормоны 124

- J Sandow, E Scheffele, M Haring, G Neef, K Prezewowsky, U Stache (2002) *Hormones* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4
- W König (2002) *Peptide and Protein Hormones* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4

Микробиологическое выщелачивание руд и биокоррозия 120

- IB Beech, J Sunner (2004) *Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. Curr Opin Biotechnol* 15, 181
- T Rohwerder, T Gehrke, K Kinzler, W Sand (2003) *Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation Appl Microb Biotechnol* 63, 239
- GJ Olson, JA Brierley, CL Brierley (2003) *Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries Appl Microb Biotechnol* 63, 249
- H Brandl (2001) *Microbial Leaching of Metals* in Biotechnology 2nd Edition, 191. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X

- GW Becker, WC MacKellar, RM Riggan, VJ Wroblewski (2000) *Human Growth Hormone* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- C Hew, G Fletcher (1997) *Transgenic fish for aquaculture*. *Chemistry & Industry* 311
- G Becker, W MacKellar, R Riggan, V Wroblewski (1995) *Hormones, Human Growth Hormone* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 13, 406. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52682-7
- W England (1995) *Hormones, Survey* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 13, 357. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52682-7
- J Sandow, E Scheiffelle, M Haring, G Neef, K Prezewowsky, U Stache (1989) *Hormones* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A13, 89. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20113-0

Гемоглобин, сывороточный альбумин и лактоферрин 126

- TM Chang (1999) *Future prospects for artificial blood*. *Trends Biotechnol* 17, 61
- W Bell (1992) *Blood, Coagulants and Anticoagulants* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 4, 333. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52672-X
- S Yamashita (1985) *Blood* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A4, 201. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20104-1
- www.aabb.org/All_About_Blood/FAQs/aabb_faqs.htm

Факторы свертывания крови 128

- EGD Tuddenheim (1997) *Haemophilia: molecular biology at the centre of human disease* in *Molecular Biology in Medicine*, 1. TM Cox, J Sinclair (ed.), Blackwell Science Ltd., ISBN 0-632-02785-1
- www.hemophilia.ca/en/index.html

Антикоагулянты и тромболитики 130

- F Jauker, W Gauss (2003) *Blutsauger in der Forschung: Hirudo medicinalis*. *Biologie in unserer Zeit* 33, 29
- J Storck (1998) *Proteasen mit Hormonfunktion: Thrombin und sein Rezeptor*. *Biologie in unserer Zeit* 28, 28
- W Bode, H Renatur (1997) Tissue-type plasminogen activator: variants and crystal/solution structures demarcate structural determinants of function. *Curr Opin Struct Biol* 6, 865
- H Jayaram, G Ahluwalia, D Cooney (1994) *Therapeutic Enzyme Applications* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 9, 621. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52677-0
- W Müller-Esterl (1993) *Kinine, Kallikreine und Kaskadensysteme*. *Biologie in unserer Zeit* 23, 184
- www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=1200000

Ингибиторы ферментов 132

- UF Wehmeier, W Piepersberg (2004) *Biotechnology and molecular biology of the α -glucosidase inhibitor acarbose* *Appl Microb Biotechnol* 63, 613
- A Muscate, C Levinson, G Kenyon (1994) *Enzyme Inhibitors* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 9, 646. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52677-0

Иммунная система 134

- C Janeway, P Travers, M Walport, MJ Shlomchik (2005) *Immunobiology*, 6th Edition, Garland Science Publishing, 0-8153-4101-6
- H Plattner, J Hentschel (1997) *Taschenlehrbuch Zellbiologie*, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-106511-7

Стволовые клетки 136

- EA Mayhall, N Paffett-Lugassy, LI Zon (2004) *The clinical potential of stem cells*. *Curr Opin Cell Biol*. 16, 713
- M Larru (2001) *Adult stem cells: an alternative to embryonic stem cells?* *Trends Biotechnol* 19, 487
- A Colman, A Kind (2000) *Therapeutic cloning: concepts and practicalities*. *Trends Biotechnol* 18, 192
- JA Thomson, JS Odorico (2000) *Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines*. *Trends Biotechnol* 18, 53
- <http://cloning.ch/>

Тканевая инженерия 138

- JA Hubbell (2004) *Tissue and cell engineering*. *Curr Opin Biotechnol*. 15, 381
- E Lavik, R Langer (2004) *Tissue engineering: current state and perspectives* *Appl Microb Biotechnol* 65, 1
- A Hubbell (2003) *Materials as morphogenetic guides in tissue engineering*. *Curr Opin Biotechnol*. 14, 551
- www.tissue-engineering.net

Интерфероны 140

- TL Nagabhushan, PP Trotta (2002) *Interferons* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4
- G Wetzel (1999) *Medical Applications of Recombinant Proteins in Humans and Animals* in *Biotechnology Second, Completely Revised Edition*, 125. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3
- H Hug, TF Sarre (1993) *Antivirale Effekte von Interferon*. *Biologie in unserer Zeit* 23, 243
- S Wong, J Xing (1995) *Immunotherapeutic Agents* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 14, 64. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52683-5
- T Nagabhushan, P Trotta (1989) *Interferons* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A14, 365. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20114-9
- www.uspharmacist.com/oldformat.as-p?url=newlook/files/Feat/interferons.htm&pub_id=8&article_id=731

Интерлейкины 142

www.copewithcytokines.de/cope.c-gi?003409

Эритропоэтин и другие факторы роста 144

G Stiegler, G Kresse, P Buckel (...) *Biotechnologische Herstellung von Arzneimitteln. Spektrum der Wissenschaft Spezial 6: Pharmaforschung*, 48

www.nierenbuch.de/6_dialyse/5172_erythropoietin.htm

www.wesfarmerslandmark.com.au

Другие белки, имеющие**медицинское значение 146**

PC Taylor, RO Williams, M Feldmann (2004) *Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. Curr Opin Biotechnol.* 15, 557

T Dörk, M Stuhmann (1996) *Molekularbiologie der Mukoviszidose. Biologie in unserer Zeit* 26, 282

www.mukoviszidose.de/

Вакцины 148

SJ Cryz Jr., M Granstrom, B Gottstein, L Perrin, A Cross, J Larrick (2002) *Immunotherapy and Vaccines* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley, ISBN 3-527-31318-4

C Hsieh, M Ritchey (1997) *Vaccine Technology* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 24, 727. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52693-2

<http://vaccines.org/>

Рекомбинантные вакцины 150

FX Berthet, T Coche, C Vinals (2001) *Applied genome research in the field of human vaccines. J Biotechnol* 85, 213

AM Walmsley, CJ Arntzen (2000) *Plants for delivery of edible vaccines. Curr Opin Biotechnol* 11, 126

Антитела 152

D Knoop (2000) *Antikörper – Biomolekule zur selektiven Anreicherung organischer Analyten. Nachr. aus der Chemie* 1056

Моноклональные антитела 154

DC Andersen, DE Reilly (2004) *Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. Curr Opin Biotechnol.* 15, 456

GL Galfre, DS Secher, PE Crawley (2002) *Monoclonal Antibodies* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley, ISBN 3-527-31318-4

G Galfre, D Secher, P Crawley (1990) *Monoclonal Antibodies* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A16, 699. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20116-5

www.antibodyresource.com/

Рекомбинантные и каталитические антитела 156

S Dübel, P Rohrbach, A Schmiedl (2005) *Rekombinante Antikörper: Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? Biologie in unserer Zeit* 34, 372

KD Wittrup (2001) *Protein engineering by cell-surface display. Curr Opin Biotechnol* 12, 395

HE Chadd, SM Chamow (2001) *Therapeutic antibody expression technology. Curr Opin Biotechnol* 12, 188

G Blackburn, A Garcon (2000) *Catalytic Antibodies* in Biotechnology 2nd Edition, 491. Vol. 8b, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28324-2

J Adair (1999) *Antibody Engineering and Expression* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 219. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3

A Racher, J Tong, J Bonnerjea (1999) *Manufacture of Therapeutic Antibodies* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 247. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3

F Breitling, S Dübel (1997) *Rekombinante Antikörper*, Spektrum Akademischer Verlag

E Driggers, PG Schultz (1996) *Catalytic Antibodies. Adv. Protein Chem.* 49, 261

Методы иммуноанализа 158

JN Miller, R Niessner, D Knopp *Enzyme and Immunoassays* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4

J Miller, R Niessner (1994) *Enzyme and Immunoassays* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B5, 129. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20135-1

Биосенсоры 160

APF Turner (2002) *Biosensors* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

FW Scheller, U Wollenberger, A Warsinke, F Lisdat (2001) *Research and development in biosensors. Curr Opin Biotechnol* 12, 35

RL Rich, DG Myszkla (2000) *Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. Curr Opin Biotechnol* 11, 54

A Warsinke (1998) *Biosensoren. Biologie in unserer Zeit* 28, 169

K Cammann, B Ross, W Hasse, C Dumschat, A Katerkamp, J Reinbold, G Steinhage, B Gründig, R Renneberg, N Buschmann (1994) *Chemical and Biochemical Sensors* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B6, 121. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20136-X

B Mattiasson (1993) *Biosensors* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 5. Vol. 4, K Schügerl (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28314-5

Животноводство 162

- H Geldermann (2005): *Tier-Biotechnologie*. E. Ulmer, ISBN 2-8252-8283-X
G Bulfield (2000) *Farm animal biotechnology. Trends Biotechnol* 18, 10

Перенос эмбрионов и клонирование животных 164

- E Wolf, V Zakhartchenko, G Brem (1998) *Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. J Biotechnol* 65, 99
U Petzold (1998) *Sag niemals nie: Neues zum Klonen von Säugetieren. Biologie in unserer Zeit* 28, 194
A Görlach (1997) *Embryotransfer beim Rind*, Enke, ISBN 3-432-27361-4
www.naab-css.org/education/biotech.html

Картирование генов 166

- GH Yue, P Bueckmann, H Bartenschlager, G Moser, H Geldermann (1999) *Rapid and precise genotyping of porcine microsatellites*. *Electrophoresis* 20, 3358
M Lucy, R Collier (1994) *Genetic Engineering, Animals in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 4th Edition 12, 465. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52681-9
G Wricke, H Geldermann, W Weber (1993) *Gene Mapping in Animals and Plants in Biotechnology* Second, Completely Revised Edition, 141. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9
H Geldermann (1990) *Application of Genome Analysis in Animal Breeding in Genome Analysis in Domestic Animals Vol. H Geldermann, F Ellendorf (ed.)*, VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28097-9

Трансгенные животные 168

- MC Lucy (2003) *Genetic Engineering, Animals in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
JW Larrick, DW Thomas (2001) *Producing proteins in transgenic plants and animals. Curr Opin Biotechnol* 12, 411
D Metzger, R Feil (1999) *Engineering the mouse genome by site-specific recombination. Curr Opin Biotechnol* 10, 470
J Schenkel (1995) *Transgene Tiere*, Spektrum-Verlag, ISBN 3-86025-269-0
G Brem (1993) *Transgenic Animals in Biotechnology* Second, Completely Revised Edition, 745. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Генетическая ферма и ксенотрансплантация 170

- A Dove (2000) *Milking the genome for profit. Nature Biotechnology* 18, 1045
NS Rudolph (1999) *Biopharmaceutical production in transgenic livestock. Trends Biotechnol* 17, 367
www.blackwellpublishing.com/journal.asp?ref=0908-665X
www.transgenics.com/products/prod.html

Растениеводство 172

- JS McLaren (2005) *Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. Trends Biotechnol.* 23, 339
AH Paterson, JE Bowers, BA Chapman, DG Peterson, J Rong, TM Wicker (2004) *Comparative genome analysis of monocots and dicots, toward characterization of angiosperm diversity. Curr Opin Biotechnol.* 15, 120
N Nals (1999) *Wie können Pflanzen eine Selbstbefruchtung vermeiden? Biologie in unserer Zeit* 29, 218
W Friedt, W Lühs (1999) *Perspektiven molekularer Pflanzenzüchtung. Biologie in unserer Zeit* 29, 142
G Röbbelen (1999) *Die historische Entwicklung der Pflanzenzüchtung in Deutschland: das Beispiel der Ölpflanze Raps. Biologie in unserer Zeit* 29, 132
RP Tengerdy, G Szakacs (1998) *Perspectives in agro-biotechnology. J Biotechnol* 66, 91

Культивирование растительных клеток: поверхностные культуры 174

- A Abou-Mandour (1996) *Zell- und Gewebe-kulturen – ihre Bedeutung für die Pflanzen-forschung. Biologie in unserer Zeit* 26, 35

Культивирование растительных клеток: суспензионные культуры 176

- J Berlin (1997) *Secondary Products from Plant Cell Cultures in Biotechnology* 2nd Edition, 593. Vol. 7, Hv Döhren, H Kleinkauf (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28310-2
SC Roberts, ML Shuler (1997) *Large-scale plant cell culture. Curr Opin Biotechnol* 8, 154
PM Kieran, PF MacLoughlin, DM Malone (1997) *Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. J Biotechnol* 59, 39
M Petersen, AW Alfermann (1993) *Plant Cell Cultures in Biotechnology* Second, Completely Revised Edition, 577. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4
A Tanaka (1987) *Large-scale cultivation of plant cells at high density: a review. Process Biochemistry* 106
<http://aggie-horticulture.tamu.edu/tiss-cult/tcintro.html>

Трансгенные растения: методы получения 178

- SJ Gurr, PJ Rushton (2005) *Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? Trends Biotechnol.* 23, 283
SJ Gurr, PJ Rushton (2005) *Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? Trends Biotechnol.* 23, 275
A Vanavichit, S Traagoonrun, T Toojinda (2001) *Genomic Mapping and Positional Cloning with Emphasis on Plant Science in Biotechnology* 2nd Edition, 165. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
JW Edwards, GM Kishore, DM Stark (2000) *Genetic Engineering, Plants in Kirk-Othmer Encyclopedia of*

Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

M Hughes (1996) *Plant Molecular Genetics*, Longman, ISBN 0-582-24730-6

J Tomiuk, A Sentker, K Wöhrmann (1996) *Das Schicksal von gentechnisch modifizierten Genen in Pflanzenpopulationen. Biologie in unserer Zeit* 26, 89

H Steinbilß (1995) *Transgene Pflanzen*, Spektrum-Verlag, 3-86025-290-9

J Edwards, G Kishore, D Stark (1994) *Genetic Engineering, Plants* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 12, 491. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52681-9

G Kahl, K Weising (1993) *Genetic Engineering of Plant Cells* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 547. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Трансгенные растения: устойчивость

к неблагоприятным воздействиям 180

CT Verrips, MM Warmoeskerken, JA Post (2001) *General introduction to the importance of genomics in food biotechnology and nutrition. Curr Opin Biotechnol* 12, 483

I Parkin, S Robinson, A Sharpe, K Rozwadowski, D Hegedus, D Lydiate (2001) *Agri-Food and Genomics* in Biotechnology 2nd Edition, 145. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5

J Mol, E Cornish, J Mason, R Koes (1999) *Novel coloured flowers. Curr Opin Biotechnol* 10, 198

AJ Büchting (1998) *Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Pflanzen in Deutschland. Biologie in unserer Zeit* 28, 16

Трансгенные растения 182

E Stoger, JK Ma, R Fischer, P Christou (2005) *Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. Curr Opin Biotechnol* 16, 167

F Carrari, E Urbanczyk-Wochniak, L Willmitzer, AR Fernie (2003) *Engineering central metabolism in crop species: learning the system. Metab Eng* 5, 191

JW Larrick, DW Thomas (2001) *Producing proteins in transgenic plants and animals. Curr Opin Biotechnol* 12, 411

G Giddings (2001) *Transgenic plants as protein factories. Curr Opin Biotechnol* 12, 450

SA Merkle, JF Dean (2000) *Forest tree biotechnology. Curr Opin Biotechnol* 11, 298

M Fladung (1998) *Transgene Bäume – Perspektiven und Grenzen. Biologie in unserer Zeit* 28, 291

Y Poirier (1999) *Production of new polymeric compounds in plants. Curr Opin Biotechnol* 10, 181

L Willmitzer (1995) *Gentechnologie bei Pflanzen. Biologie in unserer Zeit* 25, 230

L Willmitzer (1993) *Transgenic Plants* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 627. Vol. 2,

A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Вирусы 184

S Modrow, D Falke (1997) *Molekulare Virologie. Spektrum Lehrbuch*, ISBN 3-8274-1086-X

Бактериофаги 186

S McGrath, GF Fitzgerald, D van Sinderen D (2004) *The impact of bacteriophage genomics. Curr Opin Biotechnol* 15, 94

H Sandmeier, J Meyer (1993) *Bacteriophages* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 543. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Микроорганизмы 188

C Bertoldo, R Grote, G Antranikian (2001) *Biocatalysis under Extreme Conditions* in Biotechnology 2nd Edition, 61. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X

R Amann, BM Fuchs, S Behrens (2001) *The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. Curr Opin Biotechnol* 12, 231

T Schindler (1993) *Das neue Bild der Zellwand. Biologie in unserer Zeit* 23, 113

HJ Busse, EB Denner, W Lubitz (1996) *Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J Biotechnol* 47, 3

Бактерии 190

H Bahl, P Dürre (1993) *Methylophages* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 285. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

H König (1993) *Methanogens* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 251. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

L Dijkhuizen (1993) *Methylophages* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 265. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

FG Priest (1993) *Bacillus* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 367. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

G Auling (1993) *Pseudomonads* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 401 Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

W Piepersberg (1993) *Streptomycetes* and Corynebacteria in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 433. Vol. 1, 339 H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

A Segerer, R Huber, KO Stetter (1991) *Hyperthermophile Prokaryoten. Biologie in unserer Zeit* 21, 266

Некоторые бактерии, важные для биотехнологии 192

- L Eggeling, M Bott, eds (2005) *Handbook of Corynebacterium glutamicum* Taylor & Francis CRC Press, ISBN 0-8493-1821-1
- V Nagarajan, M Bramucci (2004) *Genetic Engineering, Microbes* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- M Ikeda and S Nakagawa (2003) *The Corynebacterium glutamicum genome: features and impacts on biotechnological processes* *Appl Microb Biotechnol* 62, 99
- JR Swartz (2001) *Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins*. *Curr Opin Biotechnol* 12, 195
- F Blattner, G Plunkett, C Bloch, N Perna, V Burland, M Riley, J Collado-Vides, J Glasner, C Rode, G Mayhew, J Gregor, N Davis, H Kirkpatrick, M Goeden, D Rose, B Mau, Y Shao (1997) *The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12*. *Science* 277, 1453

Грибы 194

- M Krüger, N Sievers, R Fischer (1997) *Molekularbiologie der Sporentragerentwicklung des Schimmelpilzes Aspergillus nidulans*. *Biologie in unserer Zeit* 27, 375
- F Meinhardt, K Esser (1993) *Filamentous Fungi* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 515. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Дрожжи 196

- GP Cereghino, JM Cregg (1999) *Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 422
- D Maloney (1998) *Yeasts* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 25, 761. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52694-0
- JJ Heinisch, CP Hollenberg (1993) *Yeasts* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 469. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Микроорганизмы: выделение и хранение штамма. Техника безопасности 198

- P Zimmermann, F Pfeifer (2004) *Salzliebende Mikroorganismen: Leben am Rande der Löslichkeit von Kochsalz* *Biologie in unserer Zeit* 34, 80
- K Frobel, S Metzger (2001) *New Methods of Screening in Biotechnology* in Biotechnology 2nd Edition, 41. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X

Усовершенствование штаммов микроорганизмов 200

- W Pfau (2002) *Mutagenic Agents* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4

- A Crueger (1993) *Mutagenesis in Biotechnology Second, Completely Revised Edition*, 5. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9
- J Engels, B Sprunkel, E Uhlmann (1993) *DNA Synthesis in Biotechnology Second, Completely Revised Edition*, 317. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Микроорганизмы: рост в искусственных условиях 202

- E Stoppok, K Buchholz (1996) *Sugar-Based Raw Materials for Fermentation Applications* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1
- JD Troostembergh (1996) *Starch-Based Raw Materials for Fermentation Applications* in Biotechnology 2nd Edition, 31. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1
- F Schneider, H Steinmüller (1996) *Raw Material Strategies – Economical Problems* in Biotechnology 2nd Edition, 47. Vol. 6, M Roehr (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28316-1
- S Sengha (1994) *Fermentation* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 10, 361. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52678-9
- R Greasham (1993) *Media for Microbial Fermentations* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 127. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7

Кинетика образования продуктов метаболизма и биомассы в культуре микроорганизмов 204

- CH Posten, CL Cooney (1993) *Growth of Microorganisms* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 111. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Периодическая ферментация с добавлением субстрата и непрерывная ферментация 206

- B Junker (2004) *Fermentation* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- T Yamane, S Shimizu (1984) *Fed-Batch Techniques in Microbial Processes*, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 30, 147
- T Imanaka (1993) *Strategies for Fermentation with Recombinant Organisms* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 283. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7

Технология ферментации 208

- AW Nienow (2003) *Aeration, Biotechnology* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- R Kleijntjens, K Luyben (2000) *Bioreactors* in Biotechnology 2nd Edition, 329. Vol. 11b, J Klein (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28323-4

- G Larsson, SB Jorgensen, MN Pons, B Sonnleitner, A Tijsterman, N Titchener-Hooker (1997) *Biochemical engineering science. J Biotechnol* 59, 3
- B Tarmy (1996) *Reactor Technology* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 20, 1006. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52689-4
- M Reuss (1993) *Oxygen Transfer and Mixing: Scale-Up Implications in Biotechnology* Second, Completely Revised Edition, 185. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- B Buckland, M Lilly (1993) *Fermentation – an Overview* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 7. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- J Nielsen, J Villadsen (1993) *Bioreactors: Description and Modelling* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 77. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- H Voss (1992) *Bioreactors* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B4, 381. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20134-3
- R. Buchholz (1992) *Der Bioreaktor als Lebens-raum bei der biotechnischen Produktion von Wertstoffen. Biologie in unserer Zeit* 22, 353

Промышленные процессы ферментации 210

- IJ Dunn, E Heinzle, J Ingham, JE Prenosil (2003) *Biological Reaction Engineering* Wiley-VCH, ISBN 3-527-29776-6
- P Harms, Y Rostov, G Rao (2002) *Bioprocess monitoring. Curr Opin Biotechnol.* 13, 124
- B Sonnleitner (2000) *Instrumentation of biotechnological processes. Adv Biochem Eng Biotechnol* 66, 1
- G Seidel, C Tollnick, M Beyer, K Schugerl (2000) *Online and off-line monitoring of the production of cephalosporin C by *Acetomonium chrysogenum*. Adv Biochem Eng Biotechnol* 66, 115
- HJ Henzler (2000) *Particle stress in bioreactors. Adv Biochem Eng Biotechnol* 67, 35
- DA Mitchell, M Berovic, N Krieger (2000) *Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. Adv Biochem Eng Biotechnol* 68, 61
- W Beyeler, E DaPra, K Schneider (2000) *Automation of industrial bioprocesses. Adv Biochem Eng Biotechnol* 70, 139
- T Chattaway, G Montague, A Morris (1993) *Fermentation Monitoring and Control* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 319. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- L Erickson, D Fung, P Tuitemwong (1993) *Anaerobic Fermentations* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 7. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7

Культивирование животных клеток 212

- M Butler (2005) *Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals Appl Microb Biotechnol* 68, 283
- SB Karkare (2004) *Cell Culture Technology* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- C Bardouille (2001) *Maintenance of Cell Cultures – with Special Emphasis on Eukaryotic Cells* in Biotechnology 2nd Edition, 27. Vol. 10, H Rehm (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28320-X
- F Hesse, R Wagner (2000) *Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. Trends Biotechnol* 18, 173
- H Hauser, R Wagner (1997) *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production. Walter de Gruyter*, ISBN 3-11-013403-9
- R Wolfe (1993) *Media for Cell Culture* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 141. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- M Wirth, H Hauser (1993) *Genetic Engineering of Animal Cells* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 663. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Биореакторы для культивирования животных клеток 214

- L Chu, DK Robinson (2001) *Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. Curr Opin Biotechnol* 12, 180
- WS Hu, JG Aunins (1997) *Large-scale mammalian cell culture. Curr Opin Biotechnol* 8, 148
- B Kelley, T Chiou, M Rosenberg, D Wang (1993) *Industrial Animal Cell Culture* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 23. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- J Aunins, H Henzler (1993) *Oxygen Transfer in Cell Culture Bioreactors* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 219. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- A Sambanis, W Hu (1993) *Cell Culture Bioreactors* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 105. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- R Bliem, K Konopitzky, H Katinger (1991) *Industrial animal cell reactor systems: aspects of selection and evaluation. Adv Biochem Eng Biotechnol* 44, 1

Биореакторы с иммобилизованными ферментами и клетками 216

- K Buchholz, V Kasche, UT Bornscheuer (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH, ISBN 3-527-30497-5

- A Bommarius (1993) *Biotransformations and Enzyme Reactors* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 7. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- S Furusaki, M Seki (1992) *Use and engineering aspects of immobilized cells in biotechnology*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 46, 161

Очистка биотехнологических продуктов 218

- R Rudolph, H Lilie, E Schwarz (1999) *In vitro Folding of Inclusion Body Proteins on an Industrial Scale* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 111. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3
- A Mukhopadhyay (1997) *Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 56, 61
- R Spears (1993) *Overview of Downstream Processing* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 39. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7
- J Shaeiwitz, J Henry (1988) *Separation in Biotechnology: Biochemical Separations* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B3, 11. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20133-5

Очистка биотехнологических продуктов:

хроматографические методы 220

- JA Shaeiwitz, JD Henry (2002) *Biochemical Separations* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley, ISBN 3-527-31318-4
- TM Przybycien, NS Pujar, LM Steele (2004) *Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography*. *Curr Opin Biotechnol*. 15, 469
- JA Queiroz, CT Tomaz, JM Cabral (2001) *Hydrophobic interaction chromatography of proteins*. *J Biotechnol* 87, 143
- D King (1999) *Use of Antibodies for Immuno-purification* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 275. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3
- M Ladisch (1998) *Bioseparations* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition Supplement, 89. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52696-7
- G Jagschies (1988) *Separation in Biotechnology: Process-Scale Chromatography* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B3, 10. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20133-5
- N Labrou, YD Clonis (1994) *The affinity technology in downstream processing*. *J Biotechnol* 36, 95
- AD Diamond, JT Hsu (1992) *Aqueous two-phase systems for biomolecule separation*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 47, 89
- PM Boyer, JT Hsu (1993) *Protein purification by dye-ligand chromatography*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 49, 1

Структура ДНК 224

- J Rehmann (1996) *Nucleic Acids* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 17, 507. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52686-X
- A Böck, R Wilting (1996) *Die Flexibilität des genetischen Kodes*. *Biologie in unserer Zeit* 26, 369
- F Götz (1993) *Structure and Function of DNA* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 191. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Функции ДНК 226

- R Lutz (1998) *Die Regulation der Transkription*. *Biologie in unserer Zeit* 28, 107
- M Schäfer (1992) *Das poly(A)-Ende der mRNA*. *Biologie in unserer Zeit* 22, 39

Эксперимент в генетической инженерии 228

- FJ Schmidt (2004) *Genetic Engineering, Procedures* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- T Nagabhushan, S Narula, (2002) *Genetic Engineering* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4
- D Nicholl (1995) *Gentechnische Methoden*, Spektrum-Verlag, ISBN 3-86025-298-4
- F Schmidt (1995) *Genetic Engineering, Procedures* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 12, 440. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52681-9
- V Nagarajan (1994) *Genetic Engineering, Microbes* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 12, 481. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52681-9
- B Holloway (1993) *Genetic Exchange Processes for Prokaryotes* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 47. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9
- U Stahl, K Esser (1993) *Genetic Exchange Processes in Lower Eukaryotes* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 73. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

ПЦР: метод и его практическое применение 234

- C Newton, A Graham (1994) *PCR*, 2. Auflage ed., Spektrum-Verlag, ISBN 3-8274-0190-9

Секвенирование ДНК 240

- L Middendorf, P Humphrey, N Narayanan, S Roemer (2001) *Sequencing Technology* in Biotechnology 2nd Edition, 193. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- NJ Dovichi, J Zhang (2000) *Wie die Kapillarelektrophorese das menschliche Genom sequenzierte*. *Angew. Chem.* 112, 4635
- G Volckaert, P Verhasselt, M Voet, J Robben (1993) *DNA Sequencing* in Biotechnology Second, Complete-

- ly Revised Edition, 257. *Vol. 2*, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9
- E Maier, H Lehrach (1997) *Neue Techniken zur Automatisierung in der DNA-Sequenzierung. Chem. unserer Zeit* 31, 66
- Введение ДНК в живые клетки (трансформация)** 242
- M Weber (2000) *Neue Techniken zum Gentransfer in Eukaryontenzellen. Nachr. aus der Chemie* 18
- H Schwab (1993) *Principles of Genetic Engineering for Escherichia coli* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 373. *Vol. 2*, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9
- W Wohlleben, G Muth, J Kalinowski (1993) *Genetic Engineering of Gram-Positive Bacteria* in Biotechnology Second, 343 Completely Revised Edition, 455. *Vol. 2*, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9
- U Priefer (1993) *Principles of Genetic Engineering of Gram-negative Bacteria* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 427. *Vol. 2*, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9
- P Sudbery (1993) *Genetic Engineering of Yeast* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 507. *Vol. 2*, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9
- G Turner (1993) *Genetic Engineering of Filamentous Fungi* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 529. *Vol. 2*, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Экспрессия генов 246

- S Jana, JK Deb (2005) *Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli Appl Microb Biotechnol* 57, 289
- C Gorman, C Bullock (2000) *Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. Curr Opin Biotechnol* 11, 455
- S Selbert (1999) *Genmanipulation nach Wunsch: gewebsspezifisch und induzierbar. Biologie in unserer Zeit* 29, 70
- F Baneyx (1999) *Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol* 10, 411
- R Mattes (1993) *Principles of Gene Expression* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 233. *Vol. 2*, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Выключение генов 248

- SW Ding (2000) *RNA silencing. Curr Opin Biotechnol* 11, 152
- E Uhlmann (1998) *Antisense-Oligonucleotide – ein universelles Therapieprinzip. Chem. unserer Zeit* 32, 150
- W Schuster, A Brennicke (1990) *RNA-Editing. Biologie in unserer Zeit* 20, 201

РНК 250

- FR Schmidt (2005) *About the nature of RNA interference Appl. Microb Biotechnol* 67, 429
- F Katzen, G Chang, W Kudlicki (2005) *The past, present and future of cell-free protein synthesis. Trends Biotechnol.* 23, 150
- W Filipowicz, L Jaskiewicz, FA Kolb, RS Pillai (2005) *Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. Curr Opin Struct Biol.* 15, 331
- M Kuhlmann, W Nellen (2004) *RNA interferenz: Gen, sei still! Biologie in unserer Zeit* 34, 142

Геномные библиотеки и картирование генома 252

- F Sterky, J Lundeberg (2000) *Sequence analysis of genes and genomes. J Biotechnol* 76, 1

Геномы прокариот и эукариот 254, 256

- EP Rocha (2004) *Order and disorder in bacterial genomes. Curr Opin Microbiol.* 7, 519
- A Pühler, D Jording, J Kalinowski, D Buttgereit, R Renkawitz-Pohl, L Altschmied, A Danchin, H Feldmann, H Kleink, M Kröger (2001) *Genome Projects of Model Organisms* in Biotechnology 2nd Edition, 5. *Vol. 5b*, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- F Kempken (1997) *Mobile Nukleinsäuresequenzen und die Dynamik von Genomen. Biologie in unserer Zeit* 27, 114
- S Primrose (1996) *Genomanalyse*, Spektrum-Verlag, ISBN 3-8274-0116-X
- www.tigr.org/
www.sanger.ac.uk/
www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/

Геном человека 258

- L Tsui, S Scherer (2001) *The Human Genome Project* in Biotechnology 2nd Edition, 41. *Vol. 5b*, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- H Feldmann (2000) *Das Humangenomprojekt. Chem. unserer Zeit* 34, 338
- www.genome.gov/

Функциональный анализ генома человека 260

- R Froböse (2002) *Individualisierte Medizin – Chance oder Risiko? Nachr. aus der Chemie* 50, 819
- I Brehm, U Brinkmann (2002) *Medikamente nach Maß: Pharmakogenetik Biologie in unserer Zeit* 32, 344
- R Green (2001) *Genomics and Human Disease* in Biotechnology 2nd Edition, 105. *Vol. 5b*, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- G Dellaire (2001) *Genetic Disease* in Biotechnology 2nd Edition, 61. *Vol. 5b*, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- D Ganten, K Ruckpaul (2000) *Genetisches Wissen für Gesundheit und Krankheit. Nachr. aus der Chemie* 894
- D Foernzler (2000) *SNP's: kleine genetische Varianten – große medizinische Wirkungen. Nachr. aus der Chemie* 1342

A Mange (1994) *Basic Human Genetics* Sinauer Associates, ISBN 0-87893-495-2

www.hapmap.org/

www.ncbi.nlm.nih.gov/

<http://nutrigenomics.ucdavis.edu/>

www.cephb.fr/

ДНК-анализ 262

M Woolfe, S Primrose (2004) *Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends Biotechnol.* 22, 222

C Amshoff (2001) *Gerichtsmedizin: ein Haar genügt für den genetischen Fingerabdruck. Nachr. aus der Chemie* 1355

JT Epplen, A Haupt (1997) *Gendiagnostik und Gentherapie – Ein Spannungsfeld angewandter Gentechnologie. Biologie in unserer Zeit* 27, 354

PM Hurley, CH Rodeck (1997) *Prenatal diagnosis in Molecular Biology in Medicine* 299. TM Cox, J Sinclair (ed.), Blackwell Science Ltd., ISBN 0-632-02785-1

WP Hammes, C Hertel (1995) *Mit Hilfe der Gentechnik erzeugte Lebensmittel: Novel Foods und die Problematik ihres Nachweises. Biologie in unserer Zeit* 25, 246

T Lubjuhn, M Schartl, JT Epplen (1994) *Methodik und Anwendungsgebiete des genetischen Fingerabdruckverfahrens. Biologie in unserer Zeit* 24, 9

C Bacchus (1990) *Pränatale Diagnostik. Biologie in unserer Zeit* 20, 20

www.unmc.edu/dept/geneticslab/index.cfm?L2JD=2&L1_ID=1&CONREF=2

Белковые и ДНК-чипы 264

RF Taylor (2005) *Microarrays in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849

RP Auburn, DP Kreil, LA Meadows, B Fischer, SS Matilla, S Russell (2005) *Robotic spotting of cDNA and oligonucleotide microarrays. Trends Biotechnol.* 23, 374

D Drutschmann, M Nölte, D Blohm (2002) *Virendiagnostik per Chip Nachr. aus der Chemie* 50, 454

DH Blohm, A Guiseppe-Elie (2001) *New developments in microarray technology. Curr Opin Biotechnol* 12, 41

D Tessier, D Thomas, R Brousseau (2001) *A DNA Microarrays Fabrication Strategy in Biotechnology* 2nd Edition, 227. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5

ET Fung, V Thulasiraman, SR Weinberger, EA Dalmasso (2001) *Protein biochips for differential profiling. Curr Opin Biotechnol* 12, 65

NL van Hal, O Vorst, AM van Houwelingen, EJ Kok, A Peijnenburg, A Aharoni, AJ van Tunen, J Keijer (2000) *The application of DNA microarrays in gene expression analysis, J Biotechnol* 78, 271

M Schena (2000) *Microarray Technology* Eaton Publishing, ISBN 1-881299-37-6

S Lorkowski, G Lorkowski, P Cullen (2000) *Biochips – Das leben in der Streich-holzschachtel. Chem. unserer Zeit* 34, 356

Маркерные группы 266

JC March, G Rao, WE Bentley (2003) *Biotechnological applications of green fluorescent protein Appl Microb Biotechnol* 62, 303

R Rigler (1995) *Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology. J Biotechnol* 41, 177

Генная терапия 268

RE Ashcroft (2004) *Gene therapy in the clinic: whose risks? Trends Biotechnol.* 22, 560

D Felnerova, JF Viret, R Gluck, C Moser (2004) *Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. Curr Opin Biotechnol.* 15, 518

M Thomas and AM Klibanov (2003) *Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery Appl Microb Biotechnol* 62, 27

A Mountain (2000) *Gene therapy: the first decade. Trends Biotechnol* 18, 119

N Wu, MM Ataai (2000) *Production of viral vectors for gene therapy applications. Curr Opin Biotechnol* 11, 205

A Mountain (1999) *Overview of Gene Therapy in Biotechnology* Second, Completely Revised Edition, 383. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3

B Carter (1999) *Viral Vectors for Gene Therapy in Biotechnology* Second, Completely Revised Edition, 395. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3

N Weir (1999) *Non-Viral Vectors for Gene Therapy in Biotechnology* Second, Completely Revised Edition, 427. Vol. 5a, U Ney, D Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3

www.ornl.gov/sci/techresources/Human-Genome/medicine/genetherapy.shtml

www.wiley.co.uk/genmed/clinical/

Поиск биологически активных веществ 270

T Reiss (2001) *Drug discovery of the future: the implications of the human genome project. Trends Biotechnol* 19, 496

C Ramanathan, D Davison (2001) *Pharmaceutical Bioinformatics and Drug Discovery in Biotechnology* 2nd Edition, 123. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5

JN Kyranos, H Cai, D Wei, WK Goetzinger (2001) *High-throughput high-performance liquid chromatography/mass spectrometry for modern drug discovery. Curr Opin Biotechnol* 12, 105

RM Lawn, LA Lasky (2000) *Pharmaceutical biotechnology. The genomes are just the beginning. Curr Opin Biotechnol* 11, 579

- H Bohm, G Klee, H Kubinyi (1996) *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 3-8274-0174-7
- J Gregersen (1995) *Biomedical Product Development in Biotechnology 2nd Edition*, 213. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6

Протеомика 272

- C Falter, H Lehrach (2003) *Funktionelle Charakterisierung des Proteoms Nachr. aus der Chemie* 51, 422
- WA Tao, R Aebersold (2003) *Advances in quantitative proteomics via stable isotope tagging and mass spectrometry. Curr Opin Biotechnol.* 14, 110
- N Dovichi, S Hu, D Michels, Z Zhang, S Krylov (2001) *Proteome Analysis by Capillary Electrophoresis in Biotechnology 2nd Edition*, 269. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- D Figeys (2001) *Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry for Proteomic Studies: State-of-the-Art in Biotechnology 2nd Edition*, 241. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- YF Leung, CP Pang (2001) *Trends in proteomics. Trends Biotechnol* 19, 480
- S Nock, P Wagner (2000) *Proteomics: Die post-genomische Revolution. Chem. unserer Zeit* 34, 348
- R Kellner, F Lottspeich, H Meyer (1999) *Microcharacterization of Proteins*, Wiley VCH, ISBN 3-527-30084-8
- F Lottspeich (1999) *Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 2476
- www.hupo.org/

Биоинформатика 274

- R Wünschiers (2005) *Computational Biology – eine Einführung: Datenbanken, Linux, Bioperl & Co Biologie in unserer Zeit* 35, 90
- TD Wu (2001) *Bioinformatics in the post-genomic era. Trends Biotechnol* 19, 479
- P Rice (2001) *Bioinformatics: Tools for DNA Technologies in Biotechnology 2nd Edition*, 61. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- D Wishart (2001) *Bioinformatics: Tools for Protein Technologies in Biotechnology 2nd Edition*, 325. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- E Zdobnov, R Lopez, R Apweiler, T Etzold (2001) *Bioinformatics: Using the Molecular Biology Data in Biotechnology 2nd Edition*, 281. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- M Cygler, A Matte, J Schrag (2001) *Bioinformatics: Structure Information in Biotechnology 2nd Edition*, 345. Vol. 5b, C Sensen (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28328-5
- E Poetsch (1995) *Databases in Biotechnology in Biotechnology 2nd Edition*, 323. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6

Обмен веществ 276

- G Michal (1999) *Biochemical Pathways* Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 0-471-33130-9
- R Krämer, G Sprenger (1993) *Metabolism in Biotechnology Second, Completely Revised Edition*, 50. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Метабомика и метаболическая инженерия 278

- M Koffas, G Stephanopoulos (2005) *Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology. Curr Opin Biotechnol.* 16, 361
- B Christensen, J Nielsen (2000) *Metabolic network analysis. A powerful tool in metabolic engineering. Adv Biochem Eng Biotechnol* 66, 209
- I Fotheringham (1999) *Engineering Microbial Pathways for Amino Acid Production in Biotechnology 2nd Edition*, 313. Vol. 8a, D Kelly (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6
- GN Stephanopoulos, AA Aristidou, J Nielsen (1998) *Metabolic Engineering – Principles and Methodologies*, Academic Press, ISBN 0-12-666260-6
- J Hansen, MC Kielland-Brandt (1996) *Modification of biochemical pathways in industrial yeasts. J Biotechnol* 49, 1
- H Sahn (1993) *Metabolic Design in Biotechnology Second, Completely Revised Edition*, 189. Vol. 1, H Sahn (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Системная биология 280

- S Hohmann (2005) *The Yeast Systems Biology Network: mating communities. Curr Opin Biotechnol.* 16, 356
- L Hood, JR Heath, ME Phelps, B Lin (2004) *Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. Science* 306, 640
- I Borodina, J Nielsen (2005) *From genomes to in silico cells via metabolic networks. Curr Opin Biotechnol.* 16, 350
- <http://doegenomestolife.org/> www.systemsbiology.org/

«Белая» биотехнология 282

- P Saling (2005) *Eco-Efficiency Analysis of biotechnological processes Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 1
- R Busch, T Hirth, B Kamm, M Kamm, Jthoen (2005) *Wie aus „Bio“ Chemie wird Nachr. aus der Chemie* 53, 118
- K Rabaey, W Verstraete (2005) *Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. Trends Biotechnol.* 23, 291
- JO Metzger, D Lenoir (2004) *Leitmotiv Nachhaltigkeit: erneuerbare Rohstoffe, Synthesen Nachr. aus der Chemie* 52, 666
- T Willke, KD Vorlop (2004) *Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry Appl Microb Biotechnol* 66, 131

- B Kamm, M Kamm (2004) *Principles of Biorefineries Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 137
- EuropaBio (2004) *White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future*
- J Riese, R Bachmann (2004) *Industrial Biotechnology: Turning the potential into profits*. Chemical Marketing Reporter, Dec. 1
- DP Lawrence (2004) *Environmental Impact Assessment* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- MA Paisley (2004) *Biomass Energy* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- MA Matthews (2003) *Green Chemistry* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-4849
- BA Tokay (2002) *Biomass Chemicals* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Interscience-Wiley ISBN 3-527-31318-4

www.europabio.org

www.mckinsey.com/client-service/chemicals/potential-profit.asp

Техника безопасности при проведении генно-инженерных манипуляций 284

- P Stadler, H Wehlmann (1999) *Arbeitssicherheit und Umweltschutz in Bio- und Gentechnik*, Wiley-VCH, ISBN 3-527-30005-6
- M Droge, A Puhler, W Selbitschka (1998) *Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern*. *J Biotechnol* 64, 75
- D Brauer, M Bröker, C Kellermann, E Winnacker (1995) *Biosafety in rDNA Research and Production* in Biotechnology 2nd Edition, 63. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6
- T Medley, S McCammon (1995) *Strategic Regulations for Safe Development of Transgenic Plants* in Biotechnology 2nd Edition, 197. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6
- R Simon, W Frommer (1993) *Safety Aspects in Biotechnology* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 835. Vol. 2, A Pühler (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Сертификация биотехнологической продукции 286

- RG Werner (2004) *Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals*. *J Biotechnol.* 113, 171
- H Hasskarl, R Kretzschmar, K-J Hahn, M Zahn (1991) *Pharmaceuticals, General Survey and Development* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A19, 273. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20119-X
- R Streinz (1995) *Rechtliche Probleme der Novel Food Verordnung*. *Biologie in unserer Zeit* 25, 256

Этические аспекты генетической инженерии 288

- R Hails (2004) *Bioethics for technology?* *Curr Opin Biotechnol.* 15, 250
- D Schulte (2000) *Journalisten, Gentechnik und Öffentlichkeit*. *Nachr. aus der Chemie* 626
- PJ Dale (1999) *Public reactions and scientific responses to transgenic crops*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 203
- RE Spier (1998) *Animal and plant cell technology: a critical evaluation of the technology/ society interface*. *J Biotechnol* 65, 111
- B Irrgang (1997) *Forschungsethik, Gentechnik und neue Biotechnologie*, S Hirzel, ISBN 3-8047-1452-8
- S Huttner (1995) *Government, Researchers and Activists: The Critical Public Policy Interface* in Biotechnology 2nd Edition, 459. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6
- D Macer (1995) *Biotechnology and Bioethics: What is Ethical Biotechnology?* in Biotechnology 2nd Edition, 115. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6
- E Weise, H Friege, G Altner, P Schmitz, K Klostermaier (1995) *Ethics and Industrial Chemistry* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B7, 1. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20137-8
- H Kepplinger, S Ehmgig (1995) *Press Coverage of Genetic Engineering in Germany: Facts, Faults and Causes* in Biotechnology 2nd Edition, 495. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6
- <http://bioethics.net/>

Патентование в биотехнологии 290

- S Farnley, P Morey-Nase, D Sternfeld (2004) *Biotechnology – a challenge to the patent system*. *Curr Opin Biotechnol.* 15, 254
- J Kaiser (2000) *Muß Leben patentiert werden?* *Nachr. aus der Chemie* 1077
- RS Crespi (2000) *Genomics, proteomics and patents*. *Trends Biotechnol.* 18, 405
- E Szarka (1999) *Patenting in biotechnology: a review of the 20th symposium of ECB8*. *J Biotechnol* 67, 1
- A Bieberbach (1997) *Patente im Wandel*. *Chem. unserer Zeit* 31, 190
- J Gresens (1996) *Patents and Trade Secrets* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 18, 61. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52687-8
- J Straus (1995) *Biotechnology and Intellectual Property* in Biotechnology 2nd Edition, 281. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6
- J Gregersen (1995) *Patent Applications for Biomedical Products* in Biotechnology 2th edition, 299. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6

Биотехнология в разных странах 292

Ernst & Young (2005) *Fünfter Deutscher Biotechnologie-Report*

Ernst & Young (2004) *Refocus – The European Perspective. Global Biotechnology Report 2004*

Ernst & Young (2001) *Integration – Ernst & Young's Eighth Annual European Life Science Report 2001*

Ernst & Young (2001) *Focus on Fundamentals – The Biotechnology Report*

Ernst & Young (2000) *Convergence – The Biotechnology Industry Report, Millenium Edition*

T Beppu (2000) *Development of applied microbiology to modern biotechnology in Japan. Adv Biochem Eng Biotechnol* 69, 41

R Schmid, B Chung, A Jones, S Saono, J Scriven, J Tsai (1995) *Biotechnology in the Asian-Pacific Region in Biotechnology* 2nd Edition, 369. Vol. 12, D Brauer (ed.), Wiley-VCH, ISBN 3-527-28322-6

www.ey.com/uk

Источники иллюстраций

При подготовке иллюстраций материал был взят и переработан из следующих источников:

- 9 R. Renneberg, *Biohorizonte* 1990
69 H Heslot, *Biochimie* 80: 19 (1998)
77 K Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry* 2000
93 H Uhlig, *Enzyme arbeiten für uns* 1991
91 H Uhlig, *Enzyme arbeiten für uns* 1991
103 H Uhlig, *Enzyme arbeiten für uns* 1991
109 HG Schlegel, *Mikrobiologie* 1992
109 U Präve et al., *Handbuch der Biotechnologie* 1994
129 EGD Tuddenheim in *Molecular Biology in Medicine*, TM Cox, J Sinclair (ed.). 1997
131 W Bode, H Renatur, *Current Opinions in Structural Biology* 1997
135 C Janeway, P Travers *Immunobiology*, 3d Edition 1997
143 C Janeway, P Travers *Immunobiology*, 3d Edition 1997
147 Mänge, A Mänge *Basic Human Genetics* Sinauer Associates 1992
165 Schenkel, *Transgene Tiere*, Spektrum-Verlag 1995
169 Schenkel, *Transgene Tiere*, Spektrum-Verlag 1995
185 J Black, *Microbiology – Principles and Explorations*, 4th Edition 1999
189 J Black, *Microbiology – Principles and Explorations*, 4th Edition 1999
189 J Black, *Microbiology – Principles and Explorations*, 4th Edition 1999
195 J Black, *Microbiology – Principles and Explorations*, 4th Edition 1999
197 HG Schlegel, *Mikrobiologie* 1992
199 HG Schlegel, *Mikrobiologie* 1992
217 K Buchholz, V Kasche, *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie* 1997
225 R Knippers, *Molekulare Genetik* 2001
227 R Knippers, *Molekulare Genetik* 2001
235 R Knippers, *Molekulare Genetik* 2001
239 T Brown, *Gentechnologie für Einsteiger*, 2. Auflage 1996
245 T Brown, *Gentechnologie für Einsteiger*, 2. Auflage 1996
253 TA Brown, *Genomes* 1999
255 TA Brown, *Genomes* 1999 (die genetische Karte für *Drosophila* stammt von Arthur Sturtevant)
257 TA Brown, *Genomes* 1999. Der Original-Grafik liegen folgende Veröffentlichungen zugrunde: Oliver et al., *Nature* 357, 38 (1992); San Miguel et al., *Science* 274, 765 (1996); Blattner et al., *Science* 277, 1453 (1997)
259 SB Primrose, *Genomanalyse* 1996
273 F Lottspeich, *Angewandte Chemie Int. Ed. Engl.* 38, 2476 (1999)
277 GN Stephanopoulos et al., *Metabolic Engineering – Principles and Methodologies*, 1998
279 GN Stephanopoulos et al., *Metabolic Engineering – Principles and Methodologies*, 1998
283 B Kamm, N Kamm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 1 (2004)
283 P Saling, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 137 (2004)
289 D Schulte, *Nachr. aus der Chemie A*, 626 (2000)
293 Ernst & Young Report *Integration* 2001
293 Ernst & Young Report *Focus on Fundamentals – The Biotechnology Report* 2001
293 Ernst & Young Report *Convergence – The Biotechnology Report* 2000
293 Ernst & Young Report *Refocus – The European Perspective* 2004

Бгодарности за предоставление фотографий

- 139 S. Thude, persönliche Mitteilung
145 CSIRO, Clayton, Australia, cited from *Science* 281, S.511 (1998)
147 T. Cox et al., *Molecular Biology in Medicine*, Plate 25 (1997)
169 Titelbild, *Nature* 300 (5893) (1982) 175. AJ Büchting, *Biologie in unserer Zeit* 28, S. 16(1998)
181 G Krczal, *Transgene Pflanzen in der landwirtschaftlichen Produktion*, *Nachr Chem Tech Lab* 45, S. 867 (1997)
183 Susan Colburn/Monsanto, cited from *Science* 282, S.2178 (1998)
213 B Atkinson et al., *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook* (1992)
281 K. Mauch, insilico GmbH, Stuttgart

Trotz sorgfältiger Recherchen konnten möglicherweise nicht in jedem Fall Rechteinhaber von Abbildungen ermittelt werden. Sollte dem Verlag gegenüber der Nachweis der Rechthinhaberschaft geführt werden, wird die bei wissenschaftlichen Verlagen übliche Vergütung gezahlt.

Указатель микроорганизмов

- Acetobacter** 24, 67, 199
 – *acetii* 199
 – *sp.* 25
 – *suboxydans* 60, 61, 71
Achromobacter obae 35
Acidianus 199
Acinetobacter calcoaceticus 64, 65, 199
Acremonium chrysogenum 44-47, 59
Actinoplanes 90
 – *utahensis* 132, 133
Agrobacterium 67
 – *rhizogenes* 178
 – *tumefaciens* 178, 179, 199, 242, 243
Alcaligenes 199
 – *eutrophus* 182, 183
 – *latus* 69
Amycolatopsis mediterranei 56, 57
 – *orientalis* 50, 51
Arabidopsis thaliana 72
Arthrobacter 65, 72
Arthrobacter luteus 231
Ashbya gossypii 60, 61
Aspergillus 17, 96, 101, 194, 195, 246
 – *flavus* 198, 199
 – *nidulans* 83
 – *niger* 9, 26, 27, 28, 29, 75, 81, 83, 86, 87, 88, 92, 97, 101, 194, 195, 199, 205, 222
 – *oryzae* 12, 13, 16, 17, 38, 75, 76, 83, 84, 86, 87, 100, 101, 194, 198, 232
 – *sojiae* 17, 102
 – *sp.* 77
Auromonas 67
Auromonas elodea 66
Azotobacter 67
Azotobacter vinelandii 66
- Bacillus** 62, 63, 84, 88, 101, 186, 199, 228, 242
 – *alkalophilus* 102
 – *amyloliquefaciens* 83, 86, 101, 172, 231
 – *anthracis* 54, 198, 199
 – *anthrax* 183, 288
 – *brevis* 49
 – *cereus* 86
 – *circulans* 75
 – *coagulans* 75, 90
 – *globigii* 231
 – *lentus* 85
 – *licheniformis* 49, 59, 75, 83, 86, 87
 – *megaterium* 62, 63, 75
 – *natto* 17
 – *polymyxa* 48, 49
 – *pumilus* 60, 61
 – *sp.* 38, 49, 61, 62, 84, 102
 – *sphaericus* 39
 – *stearothermophilus* 75, 76, 86, 87, 101, 199, 202
 – *subtilis* 22, 63, 64, 65, 75, 83, 84, 86, 92, 102, 126, 186, 192, 193, 198, 199, 277
 – *thermoproteolyticus* 36
 – *thermoglucosidius* 38
Beauveria gossypii 71
Bombyx mori 68
Borellia burgdorferi 58
Borrelia burgdorferi 263
Brevibacterium ammoniagenes 62
Brevibacterium fermentum 36
- Candida** 196, 197
 – *albicans* 43, 56, 196, 199
 – *antarctica B* 105
 – *boidinii* 38, 110, 111
 – *bombicola* 110
 – *lipolytica* 111
 – *rugosa* 105
 – *sp.* 61
 – *tropicalis* 110, 111, 199
Candida utilis 62, 63, 108, 109, 111, 196, 197
Cellulomonas 92
Cephalosporium acremonium 44, 194
Chaetomium cellulolyticum 108
Chlamydia trachomatis 58
Clostridium 8, 22, 92
 – *acetobutylicum* 22, 23
 – *beijerinckii* 23
 – *butyricum* 23
 – *puniceum* 23
 – *tetani* 148, 151
 – *tetanomorphum* 23
 – *thermocellum* 94
Corynebacterium 17, 65, 72, 182, 183
 – *ammoniagenes* 62, 63
 – *diphtheriae* 192
 – *glutamicum* 9, 30, 32, 34, 35, 192, 193, 278
 – *sp.* 60, 61
Cryptococcus laurentii 34, 35
Curvularia lunata 72, 73
- Desulfovibrio** 120, 121
 – *vulgaris* 120
Desulfurolobus 199
Digitalis lanata 70
- Escherichia coli** 22, 34, 36-38, 42, 43, 46, 47, 66-71, 76, 77, 94, 98, 99, 105, 106, 122-126, 129, 130, 132, 140-146, 150, 156, 157, 178-180, 182, 183, 186, 187, 189, 191-193, 196, 197, 199, 205, 212, 218, 224, 228, 231, 232, 242, 243, 246, 247, 250, 253, 254, 257, 272, 280, 285, 292

- Ectothiorhodospira* 199
Eimeria sp. 50
Endomycopsis 197
– *fibuliger* 108, 109
Erwinia herbicola 60, 61, 70
– sp. 60
- Flavobacterium** *islandicum* 199
Fusarium 14
Fusarium graminearum 108, 109
- Gallionella** 199
Geotrichum 17
Gluconobacter 24, 28
- Haemophilus** *aegyptius* 125
– *influenzae* 58, 149, 193, 231, 277
Halobacterium salinarum 68
Hansenula polymorpha 110, 111, 196, 197
Helicobacter pylori 58, 193, 263
Herpes simplex 150, 184
Histoplasma capsulatum 199
Humicola insolens 84, 92
- Klebsiella** 69
– *aerogenes* 75
– *pneumoniae* 86, 87, 191
Kluyveromyces fragilis 75, 109
– *lactis* 75, 98, 99
Konbu 32
- Lactobacillus** 28, 69, 186, 199, 228
– *acidophilus* 18, 19
– *bifidus* 18
– *brevis* 18, 19
– *bulgaricus* 19, 28
– *casei* 18, 19, 199
– *delbrueckii* 19, 28, 29
– *helveticus* 19
– *leichmannii* 28
– *salivarius* 19
Lactococcus 16
– *lactis* 18, 19
Legionella 155
Leptothrix 199
Leuconostoc 18
– *lactis* 19
– *mesenteroides* 18, 19, 66, 67
– *oenus* 75
Listeria monocytogenes 18
Lithospermum erythrorhizon 64, 65
- Melanocarpus** sp. 84
Methanopyrus 199
Methylococcus capsulatus 111
Methylomonas clara 110
Methylophilus methylotrophus 110, 111
- Micromonospora* 52
– *purpurea* 53
Monascus purpureus 16, 17
Mortierella isabellina 110
Mucor 194, 195
– *javanicus* 75
– *miehei* 98, 99
– *pusillus* 99
– *sufu* 17
Mycobacterium 72
– *bovis* 149
– *leprae* 193
– *tuberculosis* 42, 48, 56, 150, 151, 193, 199, 263, 285
– *tuberculosis* 52, 53, 58
Mycoplasma pneumoniae 193
Mytilus edulis 68, 69
- Natronobacterium** 199
Neisseria gonorrhoeae 72
– *meningitidis* 263
Nephila claviceps 68, 69
Neurospora crassa 252
Nitrosomonas 199
Nocardia 72
– *otitidis-caviarum* 231
- Ophiostoma piliferum** 94
- Paecilomyces variotii** 108, 109, 111
Pediococcus sp. 17
Penicillium 16, 28, 194, 195
– *camamberti* 194
– *chrysogenum* 44–47, 59, 205
– *citrinum* 62, 63
– *emersonii* 92
– *griseofulvum* 55
– *notatum* 194, 199
Phytophthora infestans 180
Pichia pastoris 68, 110, 111, 126, 140, 196, 197, 246, 247
Plasmodium falciparum 150, 151, 262
Propionibacterium shermanii 60
Proteus vulgaris 231
Pseudomonas 117, 186, 199, 228, 242, 285
– *aeruginosa* 43, 65, 66, 199
– *cepacia* 71, 76, 77
– *chloraphis* 76, 77
– *denitrificans* 60
– *diminuta* 46
– *putida* 192, 193, 243
– sp. 70, 71, 119, 243, 278
Pullularia 67
Pyrobaculum 199
Pyrococcus furiosus 105, 188, 234
Pyrodictium brockii 199
– *occultum* 199

- Ralstonia eutropha** 68, 69
Rhizobium 67, 199
Rhizomucor miehei 76, 77, 83, 105
Rhizopus 96, 194, 195
 – *nigricans* 194
 – *oligosporus* 16, 17
 – *oryzae* 194, 199
 – *sp.* 75, 86, 87
Rhodococcus erythropolis 64
Rhodospirillen 199
Rhodotorula glutinis 36, 37, 110
Rubella 149
- Saccharomyces** 195, 197, 260
 – *cerevisiae* 12, 14, 15, 20, 21, 75, 83, 90, 101, 108, 109, 111, 122, 132, 140, 150, 151, 189, 196, 197, 205, 224, 242, 246, 247, 252, 253, 257, 276, 277
 – *ellipsoideus* 12
Saccharopolyspora erythraea 56, 57
Salmonella 42
 – *typhimurium* 149
Schistosoma mansoni 151
Schizosaccharomyces pombe 196
Serratia marcescens 76
Staphylococcus 199
 – *aureus* 43, 152, 231
 – *carnosus* 16
Staphylococcus aureus 50
Streptococcus 16
 – *equi* 64, 65, 67
 – *mutans* 66, 182
 – *pyogenes* 18, 19
 – *sp.* 43
 – *thermophilus* 19
 – *zooepidemicus* 64
Streptomyces 48, 52, 76, 186, 228, 242
 – *aureofaciens* 54, 55
 – *aureus* 62
 – *candidus* 50, 51
 – *cinnamomensis* 50, 51
 – *clavuligerus* 46
 – *coelicolor* 192, 193
 – *erythreus* 56
 – *fradiae* 53
 – *fulvisimus* 49
 – *griseochromogenes* 50, 51
 – *griseus* 40, 53, 59
 – *hygroscopicus* 48, 53, 180, 181
 – *kanamyceticus* 53
 – *kasugaensis* 53
 – *lincolnensis* 50, 51
 – *peucetius* 55
 – *rimosus* 55
 – *roseiscleroticus* 94
 – *sp.* 59, 71, 77
 – *tenebrarius* 53
 – *toxytricinii* 132, 133
 – *venezuelae* 54, 83
 – *verticillus* 48, 49
 – *virginiae* 48, 49
Sulfolobus 199
 – *acidocaldarius* 199
- Taxus brevifolia** 70
Thermoactinomyces vulgaris 199
Thermoanaerobacter ethanolicus 20
Thermococcus 199
 – *litoralis* 105
Thermoproteus 199
Thermotoga 199
 – *maritima* 94, 105, 234
Thermus aquaticus 104, 105, 199, 228, 231, 234
Thielavia sp. 84
Thiobacillus 116, 199
 – *ferrooxidans* 121
 – *thiooxidans* 120, 121, 199
Tolypocladium inflatum 48, 49
Torulopsis 197
 – *bombicola* 64, 65
Toxoplasma sp. 50
Treponema pallidum 58, 193, 277
Trichoderma longibrachiatum 94
 – *reesei* 83, 92, 94
Trichoderma viride 101
Trichophyton rubrum 43, 199
Trypanosoma sp. 151
- Ustilago maydis** 64, 65
- Vaccinia** 150, 151
Vibrio cholerae 149, 150
 – *cholerae* 150
- Xanthomonas** 285
Xanthomonas campestris 66, 67
- Yersinia pestis** 199
- Zymomonas** 13
 – *mobilis* 20, 21, 278

Содержание

Предисловие	5
Предисловие ко 2-му изданию	6
Введение	7
История биотехнологии	
Этапы развития биотехнологии	8
Биотехнология сегодня	10
Биотехнологическое производство пищевых продуктов	
Алкогольные напитки	12
Пивоварение	14
Ферментация в пищевой промышленности	16
Пищевые продукты и молочнокислое брожение	18
Спирты, кислоты и аминокислоты	
Этиловый спирт	20
1-Бутанол, ацетон	22
Уксусная кислота	24
Лимонная кислота	26
Молочная и глюконовая кислоты	28
Аминокислоты	30
L-Глутаминовая кислота	32
D,L-Метионин, L-лизин и L-треонин	34
Аспартам™, L-фенилаланин и L-аспарагиновая кислота	36
Получение L-аминокислот в процессе ферментативной трансформации	38
Антибиотики	
Антибиотики: источники, применение и механизмы действия	40
Антибиотики: получение. Устойчивость к антибиотикам	42
β-Лактамные антибиотики: структура, биосинтез и механизм действия	44
β-Лактамные антибиотики: промышленное получение	46
Пептидные антибиотики и антибиотики – производные аминокислот	48
Гликопептидные, полиэфирные и нуклеозидные антибиотики	50
Аминогликозидные антибиотики	52
Тетрациклины, хиноны, хинолоны и другие ароматические антибиотики	54
Поликетидные антибиотики	56
Получение новых антибиотиков	58
Специальные продукты	
Витамины	60
Нуклеозиды и нуклеотиды	62
Биодетергенты и биокосметика	64
Микробные полисахариды	66
Биоматериалы	68
Биотрансформация	70
Биотрансформация стероидов	72
Ферменты	
Ферменты	74
Ферментативный катализ	76
Ферменты в клинических анализах	78
Тесты с помощью ферментов	80

Применение ферментов в промышленных технологиях	82
Ферменты в производстве моющих средств	84
Ферменты, расщепляющие крахмал.....	86
Ферментативное расщепление крахмала в промышленности	88
Ферментативное превращение сахаров	90
Утилизация целлюлозы и полиозы	92
Использование ферментов в целлюлозно-бумажной промышленности	94
Пектиназы.....	96
Ферменты в производстве молочных продуктов.....	98
Использование ферментов в хлебобулочной и мясоперерабатывающей промышленности	100
Ферменты в кожевенной и текстильной промышленности	102
Перспективы получения ферментов для промышленных технологий	104
Белковая инженерия	106

Пекарские и кормовые дрожжи

Пекарские и кормовые дрожжи.....	108
Белки и жиры из одноклеточных организмов.....	110

Биотехнология и окружающая среда

Аэробная очистка сточных вод	112
Анаэробная очистка сточных вод и переработка ила	114
Биологическая очистка газовых выбросов	116
Биологическая очистка почв	118
Микробиологическое выщелачивание руд и биокоррозия.....	120

Биотехнология в медицине

Инсулин	122
Гормон роста и другие гормоны	124
Гемоглобин, сывороточный альбумин и лактоферрин.....	126
Факторы свертывания крови.....	128
Антикоагулянты и тромболитики	130
Ингибиторы ферментов	132
Иммунная система	134
Стволовые клетки.....	136
Тканевая инженерия	138
Интерфероны	140
Интерлейкины	142
Эритропоэтин и другие факторы роста	144
Другие белки, имеющие медицинское значение	146
Вакцины.....	148
Рекомбинантные вакцины	150
Антитела	152
Моноклональные антитела	154
Рекомбинантные и каталитические антитела	156
Методы иммуноанализа	158
Биосенсоры	160

Биотехнология в сельском хозяйстве

Животноводство.....	162
Перенос эмбрионов и клонирование животных	164
Картирование генов.....	166
Трансгенные животные	168
Генетическая ферма и ксенотрансплантация	170
Растениеводство	172
Культивирование растительных клеток: поверхностные культуры	174
Культивирование растительных клеток: суспензионные культуры	176

Трансгенные растения: методы получения	178
Трансгенные растения: устойчивость к неблагоприятным воздействиям.....	180
Трансгенные растения	182

Основы микробиологии

Вирусы	184
Бактериофаги	186
Микроорганизмы.....	188
Бактерии.....	190
Некоторые бактерии, важные для биотехнологии.....	192
Грибы	194
Дрожжи	196
Микроорганизмы: выделение и хранение штамма. Техника безопасности.....	198
Усовершенствование штаммов микроорганизмов.....	200

Основы биотехнологических методов

Микроорганизмы: рост в искусственных условиях	202
Кинетика образования продуктов метаболизма и биомассы в культуре микроорганизмов.....	204
Периодическая ферментация с добавлением субстрата и непрерывная ферментация.....	206
Технология ферментации.....	208
Промышленные процессы ферментации.....	210
Культивирование животных клеток.....	212
Биореакторы для культивирования животных клеток.....	214
Биореакторы с иммобилизованными ферментами и клетками.....	216
Очистка биотехнологических продуктов	218
Очистка биотехнологических продуктов: хроматографические методы.....	220
Экономические аспекты биотехнологического производства.....	222

Методы генетической инженерии

Структура ДНК	224
Функции ДНК.....	226
Эксперимент в генетической инженерии.....	228
Методы выделения ДНК.....	230
Ферменты, модифицирующие ДНК	232
ПЦР: метод и его практическое применение.....	234
ПЦР: лабораторная практика.....	236
ДНК: химический синтез и определение размера молекул.....	238
Секвенирование ДНК.....	240
Введение ДНК в живые клетки (трансформация)	242
Идентификация и клонирование генов.....	244
Экспрессия генов	246
Выключение генов.....	248
РНК.....	250
Геномные библиотеки и картирование генома	252
Геном прокариот	254
Геном эукариот.....	256
Геном человека.....	258
Функциональный анализ генома человека.....	260
ДНК-анализ	262
Белковые и ДНК-чипы.....	264
Маркерные группы	266

Тенденции развития

Генная терапия.....	268
Поиск биологически активных веществ	270
Протеомика.....	272

Биоинформатика	274
Обмен веществ	276
Метаболомика и метаболическая инженерия	278
Системная биология	280
«Белая» биотехнология	282
Техника безопасности, этические и экономические аспекты	
Техника безопасности при проведении генно-инженерных манипуляций	284
Сертификация биотехнологической продукции	286
Этические аспекты генетической инженерии	288
Патентование в биотехнологии	290
Биотехнология в разных странах	
Биотехнология в разных странах	292
Литература	294
Источники иллюстраций	317
Указатель микроорганизмов	318

Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программы Adobe Reader версии не ниже 11-й для платформ Windows, Mac OS, Android, iOS, Windows Phone и BlackBerry; экран 10"

Справочное электронное издание

Шмид Рольф

**НАГЛЯДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ
И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ**

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*

Редакторы *Е. В. Гуляева, Л. Н. Коробкова*

Художественный редактор *Н. А. Новак*

Технический редактор *Е. В. Денюкова*

Компьютерная верстка: *Т. Э. Внукова*

Подписано к использованию 10.02.15. Формат 165×225 мм

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272

e-mail: binom@Lbz.ru, <http://www.Lbz.ru>



Рольф Шмид родился в 1942 г. в Зальцбурге, Австрия. Окончил Мюнхенский университет и продолжил образование по химии во Фрайбургском университете. Докторскую диссертацию он выполнил в группе Ганса Грисбаха. После защиты диссертации работал во Франции, в США, а с 1972 г. в лаборатории фирмы Henkel в Дюссельдорфе, где руководил исследовательским отделом по биотехнологии. В 1987 г. он вошел в руководящий состав отделения ферментативных технологий Научно-исследовательского биотехнологического центра в Браншвейге, с 1993 г. руководил строительством здания для нового Института технической биохимии при Штутгартском университете. Этот институт профессор Шмид возглавляет в настоящее время.

Биотехнология – междисциплинарная область знаний. В XXI в. она стремительно продвигается на ключевые позиции в цикле естественных наук. Валовый продукт биотехнологических производств растет из года в год и уже превышает объем традиционных технологий. Достижения генетической инженерии активно внедряются не только в промышленность, но и в медицину. В качестве альтернативных источников энергии уже применяют биоэтанол и «биодизель», которые получают из растительного (возобновляемого) сырья. Подобные «белые» биотехнологии имеют большое будущее.

При изучении этой книги, которая построена, как атлас, вы получите достаточно полное представление о всем многообразии современной биотехнологии и ее важном промышленном и гуманитарном значении.

Для студентов, изучающих биотехнологию, биологию и биохимию, студентов-медиков, а также преподавателей и специалистов.