

Ю. О. САЗЫКИН, С. Н. ОРЕХОВ, И. И. ЧАКАЛЕВА

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Под редакцией А. В. КАТЛИНСКОГО

Рекомендовано

Учебно-методическим объединением

по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России

в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по специальности

060108 (040500) «Фармация»



Москва

Издательский центр «Академия»

2006

УДК 615.1(075.8)

ББК 30.16я73

С148

Рецензенты:

канд. мед. наук, доцент *А. В. Казьянин*;
канд. фармацевт. наук, профессор *Г. И. Олешко*

Сазыкин Ю. О.

С148 Биотехнология : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева ; под ред. А. В. Катлинского. — М. : Издательский центр «Академия», 2006. — 256 с.
ISBN 5-7695-2899-0

Рассмотрены основные объекты биотехнологии, способы их создания и совершенствования методами клеточной и генетической инженерии, возможности интенсификации биотехнологического производства методами инженерной энзимологии. Особое внимание уделено проблемам скрининга биотехнологических препаратов на основе данных геномики, протеомики и биоинформатики, перспективам сочетания методов биосинтеза и органического синтеза при создании новых лекарственных средств. Даны сведения о промышленном производстве аминокислот, стероидов, антибиотиков, иммунобиопрепаратов, ферментов медицинского происхождения и других биотехнологических препаратов. Приведен краткий терминологический словарь.

Для студентов высших фармацевтических учебных заведений.

УДК 615.1(075.8)

ББК 30.16я73

*Оригинал-макет данного издания является собственностью
Издательского центра «Академия», и его воспроизведение любым способом
без согласия правообладателя запрещается*

© Сазыкин Ю. О., Орехов С. Н., Чакалева И. И., 2006
© Образовательно-издательский центр «Академия», 2006
© Оформление. Издательский центр «Академия», 2006

ISBN 5-7695-2899-0

Биотехнология — одна из важнейших современных научных дисциплин, необходимых фармацевту, работающему как в лабораториях и цехах предприятий, выпускающих лекарственные средства, так и в аптеках и контрольных учреждениях. В каждом случае помимо знания общих основ этой науки (и сферы производства) обязательно также глубокое знакомство с теми ее разделами, которые будут наиболее близки профилю работы специалиста. Знакомство с биотехнологией необходимо всем выпускникам медицинских вузов независимо от их специализации: биотехнологические методы все более интенсивно проникают в практику диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний, современные же концепции биотехнологии способствуют формированию мировоззрения человека, адекватного стремительному течению научно-технического прогресса в современном мире.

В общем смысле технология, как правило, связана с производством, целью которого является удовлетворение потребностей человеческого общества. Иногда высказывается мнение, что биотехнология — это осуществление природного процесса в искусственных, созданных человеком условиях. Однако в последнее десятилетие на основе биотехнологических методов в биореакторах (техногенных нишах) воспроизводятся не только природные, но и не протекающие в природе процессы с использованием ферментов (биокатализаторов — бесклеточных ферментных комплексов), одноклеточных и многоклеточных организмов.

В настоящее время биотехнология решает проблемы не только медицины или создания пищевых продуктов путем ферментации (традиционной области ее применения); с ее помощью ведется, например, разработка полезных ископаемых, решается проблема энергоресурсов, ведется борьба с нарушениями экологического равновесия и т.д. В некоторых странах (например, Японии) биотехнология объявлена «стратегической индустрией», а в других (например, Израиле) включена в число научных направлений с указанием «национальный приоритет». В США число биотехнологических фирм за 1985 — 2005 гг. достигло полутора тысяч. В Европе их несколько сотен.

Характерен рост числа специализированных периодических изданий по биотехнологии, выпускаемых в разных странах, международных и региональных биотехнологических конгрессов и конференций.

Биотехнология включена в учебные программы не только медицинских, но и технических вузов, а также университетов.

Общепризнано, что содержанием биотехнологии является использование достижений фундаментальных биологических наук в практических целях. Четверть века назад Европейская федерация по биотехнологии выдвинула следующий тезис: «Биотехнология — применение биологических систем и процессов в промышленности и сфере услуг», не подчеркнув научное содержание биотехнологии; кроме того, слишком широким представляется понятие «сфера услуг». На одном из конгрессов 10 лет спустя было дано более подробное определение: «Биотехнология — это наука об основах реализации процессов получения с помощью биокатализаторов разных продуктов и об использовании таких процессов при защите окружающей среды», все же неоправданно сужающее ее возможности.

В некоторых учебных пособиях биотехнология трактуется как «направление научно-технического прогресса, использующее биологические процессы и агенты для целенаправленного воздействия на природу, а также в интересах промышленного получения полезных для человека продуктов, в частности лекарственных средств».

Из этого и предыдущих определений следует, что биотехнология — и наука, и сфера производства. Она включает разделы энзимологии, промышленной микробиологии, прикладной биохимии, медицинской микробиологии и биохимии, а также разделы, связанные с конструированием заводского оборудования и созданием специализированных поточных линий.

В современных условиях нередко наблюдается тесное переплетение биотехнологии и биоорганической химии. Так, при получении многих лекарственных веществ используются перемежающиеся этапы био- и органического синтеза с последующей трансформацией целевых продуктов, осуществляемой биологическим или химическим методом. При обсуждении перспектив биотехнологии и ее стратегических целей все чаще подчеркивается ее связь с молекулярной биологией и молекулярной генетикой. Широкое распространение получило понятие молекулярной биотехнологии как научной дисциплины, уже в основном сформировавшейся на стыке технологии рекомбинантной ДНК (генетическая или генная инженерия) и традиционных биологических дисциплин, в первую очередь микробиологии, что объясняется техническими причинами более легкого оперирования микробными клетками. Ведется конструирование новых продуцентов биологически актив-

ных веществ с помощью технологии рекомбинантной ДНК. В настоящее время бурно развивается и такая область молекулярной генетики как геномика, основная цель которой — полное познание генома, т.е. совокупности всех генов любой клетки, включая клетки человека. Путем секвенирования — установления полной последовательности нуклеотидов в каждом без исключения гене создается своеобразное «досье», отражающее не только видовые, но и индивидуальные особенности организма.

В проблемных научных статьях можно встретить рассчитанные на эффект и свободные от каких-либо догм высказывания о биотехнологии некоторых крупных экспериментаторов, носящие своего рода мировоззренческий характер, например: «Биотехнология — это приближение к Богу». Здесь подразумевается, что такая кардинальная цель молекулярной биологии и молекулярной генетики как познание генома человека — это заигрывание с Богом, а последующее оперирование геномом, его совершенствование (область биотехнологии) — попытка человека приблизиться по могуществу к Богу.

В развитии биотехнологии выделяют следующие периоды: эмпирический, научный, современный (молекулярный). Последний специально отделяется от предыдущего, так как биотехнологи уже могут создавать и использовать в производстве неприродные организмы, полученные генно-инженерными методами.

Эмпирическая биотехнология неотделима от цивилизации, преимущественно как сфера производства (с древнейших времен — приготовление теста, получение молочнокислых продуктов, сыро-, виноделие, пивоварение, ферментация табака и чая, выделка кож и обработка растительных волокон). В течение тысячелетий человек применял в своих целях ферментативные процессы, не имея понятия ни о ферментах, ни о клетках с их видовой специфичностью и, тем более, генетическим аппаратом. Причем прогресс точных наук долгое время не влиял на технологические приемы, используемые в эмпирической биотехнологии.

Быстрое развитие биотехнологии как научной дисциплины с середины XIX в. было инициировано работами Л. Пастера (1822 — 1895).

Именно Л. Пастер ввел понятие биообъекта, не прибегая, впрочем, к такому термину, доказал «живую природу» брожений: каждое осуществлявшееся в производственных условиях брожение (спиртовое, уксусно-, молочнокислое и т.д.) вызывается своим микроорганизмом, а срыв производственного процесса обусловлен несоблюдением чистоты культуры микроорганизма, являющегося в данном случае биообъектом.

Практическое значение этих исследований Л. Пастера сводится к требованию поддержания чистоты культуры, т.е. к проведению производственного процесса с индивидуальным, имеющим точные характеристики биообъектом.

Позднее, приступив к работам в области медицины, Л. Пастер исходил из своей концепции о причине заразных болезней, сводя ее в каждом случае к конкретному, определенному микроорганизму. Хотя техника того времени не позволяла увидеть возбудителя инфекции, как, например, в случае вируса бешенства, однако Л. Пастер считал, что «мы его не видим, но мы им управляем». Целенаправленное воздействие на возбудителя инфекции (в целях ослабления его патогенности) позволяет получать вакцины. Ослабленный патоген и животное, в организм которого он введен, могут рассматриваться как своеобразный биообъект, а получаемая вакцина — как биотехнологический препарат. Л. Пастер создал строгие научные основы получения вакцин, тогда как замечательные достижения Э. Дженнера в борьбе с оспой были результатом освоения эмпирического опыта индийской медицины.

Современная биотехнология, основанная на достижениях молекулярной биологии, молекулярной генетики и биоорганической химии (на практическом воплощении этих достижений), выросла из биотехнологии Л. Пастера и, являясь также строго научной, отличается от последней прежде всего тем, что способна создавать и использовать в производстве неприродные биообъекты, что отражается как на производственном процессе в целом, так и на свойствах новых биотехнологических продуктов.

Говоря о биотехнологии, нельзя не упомянуть публикацию в 1953 г. первого сообщения о двуспиральной структуре ДНК, ставшего основополагающим для возникновения указанных фундаментальных дисциплин, достижения которых реализуются в современной биотехнологии. В результате серий публикаций в 1960-х гг. в литературу были внедрены принципиально важные для биотехнолога понятия «оперон» и «структурный ген». В 1973 г. было опубликовано сообщение об успешном переносе генов из одного организма в другой — в сущности, уже о технологии рекомбинантной ДНК, определяющей возникновение генетической инженерии. В 1980 г. Верховный суд США признал, что генно-инженерные микроорганизмы могут быть запатентованы, а развитие биотехнологических методов получило юридический статус. В 1990 г. произошли два принципиально важных события: была разрешена генотерапия (но только применительно к соматическим клеткам человека, т. е. без передачи чужого гена потомству) и утвержден международный проект «Геном человека». Образно говоря, человеку было юридически разрешено познавать свою сущность.

В настоящее время интенсивно растет количество таких успешно применяемых в медицине биотехнологических продуктов, как рекомбинантные белки, вторичные метаболиты микроорганизмов и растений, а также полусинтетических лекарственных агентов, являющихся продуктами одновременно био- и оргсинтеза.

Глава 1

БИООБЪЕКТЫ: СПОСОБЫ ИХ СОЗДАНИЯ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ

1.1. Понятие «биообъект»

Биообъект — центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, создающий его специфику.

Биообъектом может быть целостный сохранивший жизнеспособность многоклеточный или одноклеточный организм. Им могут являться изолированные клетки многоклеточного организма, а также вирусы и выделенные из клеток мультиферментные комплексы, включенные в определенный метаболический процесс. Наконец, биообъектом может быть индивидуальный изолированный фермент.

Функция биообъекта — полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Биообъект, осуществляющий полный биосинтез целевого продукта, называется продуцентом. Биообъект, являющийся индивидуальным ферментом или выполняющий функцию одной ферментативной реакции, используемой биотехнологом, называют промышленным биокатализатором.

Таким образом, к биообъектам относятся как макромолекулы, так микро- и макроорганизмы.

В качестве макромолекул в промышленном производстве используются ферменты всех известных классов, но наиболее часто — гидролазы и трансферазы.

Доказано, что использование ферментов в производстве в иммобилизованном виде, т.е. связанных с нерастворимым носителем, наиболее рационально, так как в этом случае обеспечиваются многократность их применения и стандартность повторяющихся производственных циклов.

С некоторой условностью «Лестница живых существ» начинается с вирусов. Последние в качестве биообъектов (с ослабленной патогенностью) используются прежде всего для приготовления вакцин.

Как биообъекты микробные клетки прокариот и эукариот в современном биотехнологическом производстве занимают доминирующее положение. Они являются продуцентами используемых в качестве лекарственных средств первичных метаболитов: аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов медицинского назначения, применяемых в заместительной терапии и т.д.

Микроорганизмы образуют огромное количество вторичных метаболитов, многие из которых также нашли применение, например, антибиотики и другие корректоры гомеостаза клеток млекопитающих.

Пробиотики — препараты на основе биомассы отдельных видов микроорганизмов используются при дисбактериозах для нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Микроорганизмы необходимы также при производстве вакцин. Наконец, микробные клетки методами генной инженерии могут быть превращены в продуценты видоспецифических для человека белковых гормонов, белковых факторов неспецифического иммунитета и т.д.

Высшие растения являются традиционным и к настоящему времени все еще наиболее обширным источником получения лекарственных средств. При использовании растений в качестве биообъектов основное внимание сосредоточено на вопросах культивирования растительных тканей на искусственных средах (каллусные и суспензионные культуры) и открывающихся при этом новых перспективах.

Традиционными поставщиками лекарственных и диагностических средств являются представители животного мира. Довольно часто в качестве биообъектов выступают млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии, членистоногие, рыбы, моллюски. Разнообразие образуемых ими биологически активных соединений, нашедших применение в медицине, крайне велико.

В последние годы в связи с развитием технологии рекомбинантной ДНК стремительно возрастает важность такого биообъекта как человек, хотя на первый взгляд это кажется парадоксальным.

В принципе, человек уже давно мог быть отнесен к биообъектам, например, при получении гомологичной антисыворотки или в случае использования тканей и органов человека для их пересадки, например, костного мозга, почек и т.д.

Однако биообъектом с позиций биотехнологии (при использовании биореакторов) человек стал лишь после реализации возможности клонирования его ДНК (точнее ее экзонов) в клетках микроорганизмов. За счет такого подхода был ликвидирован дефицит сырья для получения видоспецифических белков человека.

1.2. Совершенствование биообъектов методами мутагенеза и селекции

Как правило, работающий с биообъектом биотехнолог крайне заинтересован в его совершенствовании независимо от того, на какой ступени «лестницы живых существ» находится этот биообъект. Если организм, выделенный из природной среды («дичок») не будет подвергнут совершенствованию, то производственный процесс образования целевого продукта или экономически нецелесообразен, или технически трудно осуществим. Наиболее четко эта тенденция прослеживается в случае биообъектов, принадлежащих к микроорганизмам. Изменение биообъекта, благоприятное для его использования в производстве, должно передаваться по наследству и, соответственно, вызываться мутацией. На биохимическом уровне мутация — изменение первичной структуры ДНК в конкретном ее участке, что, в конечном счете, приводит к изменению фенотипа биообъекта. Меняется биосинтетическая способность биообъекта: изменяется либо набор его ферментов, либо активность некоторых из них.

Подчеркнем, что мутации — это первоисточник изменчивости организмов, создающий основу для эволюции. Однако во второй половине XIX в. для микроорганизмов был открыт еще один источник изменчивости — перенос чужеродных генов — своего рода «генная инженерия природы».

Долгое время понятие мутации относили только к хромосомам у прокариот и хромосомам (ядру) у эукариот. В настоящее время кроме хромосомных мутаций появилось также понятие мутаций цитоплазматических (плазмидных — у прокариот, митохондриальных и плазмидных — у эукариот).

Мутации могут быть обусловлены как перестройкой репликона (изменением в нем числа и порядка расположения генов), так и изменениями внутри индивидуального гена.

Применительно к любым биообъектам, но особенно часто в случае микроорганизмов, выявляются так называемые спонтанные мутации, обнаруживаемые в популяции клеток без специального воздействия на нее.

По выраженности почти любого признака клетки в микробной популяции составляют вариационный ряд. Большинство клеток имеют среднюю выраженность признака. Отклонения «+» и «-» от среднего значения встречаются в популяции тем реже, чем больше величина отклонения в любую сторону (рис. 1). Первоначальный, самый простой подход к совершенствованию биообъекта заключался в отборе отклонений «+» (предполагая, что именно эти отклонения соответствуют интересам производства). В новом клоне (генетически однородное потомство одной клетки; на твер-

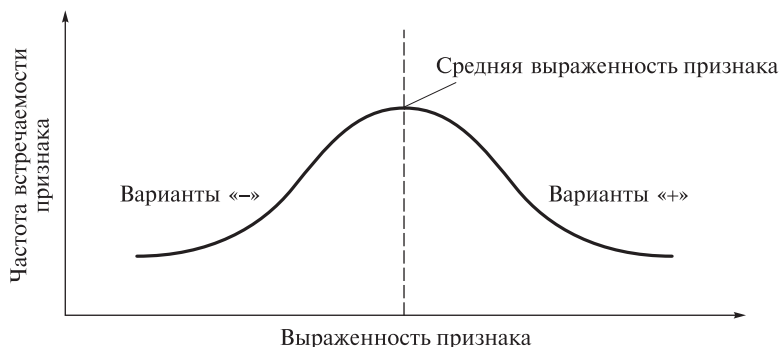


Рис. 1. Вариационный ряд

дой среде — колония), полученном из клетки с отклонением «+» вновь проводился отбор по тому же принципу. Однако такая процедура при ее неоднократном повторении довольно быстро теряет эффективность, т.е. отклонения «+» становятся в новых клонах все меньше и меньше по величине.

Спонтанные мутации встречаются, как правило, довольно редко. Разброс по степени выраженности признаков обычно невелик.

Совершенствование биообъектов путем предварительного мутагенеза и последующей селекции оказалось гораздо более действенным. В этом случае разброс мутантов по выраженности признаков (как «+», так и «-») резко увеличивается. Среди них оказываются мутанты с пониженной способностью к реверсии, т.е. со стабильно измененным признаком. Мутагенез осуществляется при обработке биообъекта физическими или химическими мутагенами. В первом случае, как правило, это ультрафиолетовые, гамма-, рентгеновские лучи; во втором — нитрозометилмочевина, нитрозогуанидин, акридиновые красители, некоторые природные вещества (например, из ДНК-тропных антибиотиков вследствие их токсичности не применяемых в клинике инфекционных заболеваний). Механизм активности как физических, так и химических мутагенов связан с их непосредственным действием на ДНК (прежде всего на азотистые основания ДНК, что выражается в сшивках, димеризации, алкилировании последних, интеркаляции между ними).

Подразумевается, естественно, что повреждения не приводят к летальному исходу. Таким образом, после обработки биообъекта мутагенами (физическими или химическими) их воздействие на ДНК приводит к частому наследственному изменению уже на уровне фенотипа (тех или иных его свойств). Последующей задачей является отбор и оценка именно нужных биотехнологу мутаций. Для их выявления обработанную культуру высеивают на твер-

дые питательные среды разных составов, предварительно разведя ее с таким расчетом, чтобы на твердой среде не было сплошного роста, а формировались отдельные колонии, образуемые при размножении именно отдельных клеток. Затем каждую колонию пересеивают и полученную культуру (клон) проверяют по тем или иным признакам в сравнении с исходной. Эта селекционная часть работы в целом весьма трудоемка, хотя приемы, позволяющие повысить ее эффективность, постоянно совершенствуются.

Так, изменяя состав твердых питательных сред, на которых вырастают колонии, можно сразу получить первоначальные сведения о свойствах клеток этой колонии в сравнении с клетками исходной культуры. Для высевания клонов с разными особенностями метаболизма используют так называемый «метод отпечатков», разработанный Дж.Ледербергом и Э.Ледерберг. Популяцию микробных клеток разводят так, чтобы на чашке Петри с питательной средой выросло около ста колоний и они были бы четко разделены. На металлический цилиндр диаметром, близким к диаметру чашки Петри, надевают бархат; затем все стерилизуют, создавая, таким образом, «стерильное бархатное дно» цилиндра. Далее прикладывают это дно к поверхности среды в чашке с выросшими на ней колониями. При этом колонии как бы «отпечатываются» на бархате. Затем этот бархат прикладывают к поверхности сред разного состава. Таким образом можно установить: какая из колоний в исходной чашке (на бархате расположение колоний отражает их расположение на поверхности твердой среды в исходной чашке) соответствует, например, мутанту, нуждающемуся в конкретном витамине, или конкретной аминокислоте; или какая колония состоит из мутантных клеток, способных к образованию фермента, окисляющего определенный субстрат; или какая колония состоит из клеток, получивших резистентность к тому или иному антибиотику и т.п.

В первую очередь биотехнолога интересуют мутантные культуры, обладающие повышенной способностью к образованию целевого продукта. Продуцент целевого вещества, наиболее перспективный в практическом отношении, может многократно обрабатываться разными мутагенами. Новые мутантные штаммы, получаемые в научных лабораториях разных стран мира, служат предметом обмена при творческом сотрудничестве, лицензионной продаже и т.п.

Потенциальные возможности мутагенеза (с последующей селекцией) обусловлены зависимостью биосинтеза целевого продукта от многих метаболических процессов в организме продуцента. Например, повышенную активность организма, образующего целевой продукт, можно ожидать, если мутация привела к дупликации (удвоению) или амплификации (умножению) структурных генов, включенных в систему синтеза целевого продукта. Да-

лее активность можно повысить, если за счет разных типов мутаций будут подавлены функции репрессорных генов, регулирующих синтез целевого продукта. Весьма эффективный путь увеличения образования целевого продукта — нарушение системы ретроингибирования. Повысить активность продуцента можно также, изменив (за счет мутаций) систему транспорта предшественников целевого продукта в клетку. Наконец, иногда целевой продукт при резком увеличении его образования отрицательно влияет на жизнеспособность собственного продуцента (так называемый суицидный эффект). Повышение резистентности продуцента к образуемому им же веществу часто необходимо для получения, например, суперпродуцентов антибиотиков.

Помимо дупликации и амплификации структурных генов мутации могут носить характер делеции — «стирания», т. е. «выпадения» части генетического материала. Мутации могут быть обусловлены транспозицией (вставкой участка хромосомы в новое место) или инверсией (изменением порядка расположения генов в хромосоме). При этом геном мутантного организма претерпевает изменения, ведущие в одних случаях к потере мутантом определенного признака, а в других — к возникновению у него нового признака. Гены на новых местах оказываются под контролем иных регуляторных систем. Кроме того, в клетках мутанта могут появиться несвойственные исходному организму гибридные белки за счет того, что под контролем одного промотора оказываются полинуклеотидные цепи двух (или более) структурных генов, ранее отдаленных один от другого.

Немалое значение для биотехнологического производства могут иметь и так называемые «точечные» мутации. В этом случае изменения происходят в пределах только одного гена. Например, выпадение или вставка одного или нескольких оснований. К «точечным» мутациям относятся трансверсия (когда происходит замена пурина на пиримидин) и транзиция (замена одного пурина на другой пурин или одного пиримидина на другой пиримидин). Замены в одной паре нуклеотидов (минимальные замены) при передаче генетического кода на стадии трансляции ведут к появлению в кодируемом белке вместо одной аминокислоты другой. Это может резко изменить конформацию данного белка и, соответственно, его функциональную активность, особенно в случае замены аминокислотного остатка в активном или аллостерическом центре.

Одним из самых блестящих примеров эффективности мутагенеза с последующей селекцией по признаку увеличения образования целевого продукта является история создания современных суперпродуцентов пенициллина. Работа с исходными биообъектами — штаммами (штамм — клонированная культура, однородность которой по определенным признакам поддерживается отбором) гриба

Penicillium chrysogenum, выделенными из природных источников, велась с 1940-х гг. в течение нескольких десятилетий во многих лабораториях. Вначале некоторый успех был достигнут при отборе мутантов, появившихся в результате спонтанных мутаций. Затем перешли к индуцированию мутаций физическими и химическими мутагенами. В результате ряда удачных мутаций и ступенчатого отбора все более продуктивных мутантов активность штаммов *Penicillium chrysogenum*, используемых в промышленности стран, где производят пенициллин, сейчас в 100 тыс. раз выше, чем у обнаруженного А. Флемингом исходного штамма, с которого и началась история открытия пенициллина.

Производственные штаммы (применительно к биотехнологическому производству) с такой высокой продуктивностью (это относится не только к пенициллину, но и к другим целевым продуктам) крайне нестабильны вследствие того, что многочисленные искусственные изменения в геноме клеток штамма сами по себе для жизнеспособности этих клеток положительного значения не имеют. Поэтому мутантные штаммы требуют постоянного контроля при хранении: популяцию клеток высеивают на твердую среду и полученные из отдельных колоний культуры проверяют на продуктивность. При этом ревертанты — культуры с пониженной активностью отбрасывают. Реверсия объясняется обратными спонтанными мутациями, ведущими к возвращению участка генома (конкретного фрагмента ДНК) в его первоначальное состояние. Специальные ферментные системы репарации участвуют в реверсии к норме — в эволюционном механизме поддержания постоянства вида.

Совершенствование биообъектов применительно к производству не исчерпывается только повышением их продуктивности. Хотя это направление, несомненно, является главным, но оно не может быть единственным: успешная работа биотехнологического производства определяется многими факторами. С экономической точки зрения весьма важно получение мутантов, способных использовать более дешевые и менее дефицитные питательные среды. Если для работы в исследовательской лаборатории дорогие среды не создают особых финансовых проблем, то при крупнотоннажном производстве понижение их стоимости (хотя и без увеличения уровня активности продуцента) крайне важно.

Другой пример: в случае некоторых биообъектов культуральная жидкость после окончания ферментации имеет неблагоприятные в технологическом отношении реологические свойства. Поэтому в цехе выделения и очистки целевого продукта, работая с культуральной жидкостью повышенной вязкости, сталкиваются с трудностями при использовании сепараторов, фильтр-прессов и т.д. Мутации, соответствующим образом меняющие метаболизм биообъекта, в значительной мере снимают эти трудности.

Большое значение в отношении гарантии надежности производства приобретает получение фагоустойчивых биообъектов. Соблюдение асептических условий при проведении ферментации прежде всего касается предотвращения попадания в посевной материал (а также в ферментационный аппарат) клеток и спор посторонних бактерий и грибов (в более редких случаях водорослей и простейших). Предотвратить проникновение в ферментер фагов вместе с технологическим воздухом, стерилизуемым путем фильтрации, крайне трудно. Не случайно вирусы в первые годы после их открытия именовали «фильтрующимися». Поэтому основной путь борьбы с бактериофагами, актинофагами и фагами, поражающими грибы, — получение устойчивых к ним мутантных форм биообъектов.

Не касаясь специальных случаев работы с биообъектами-патогенами, следует подчеркнуть, что иногда задача совершенствования биообъектов исходит из требований промышленной гигиены. Например, выделенный из природного источника продуцент одного из важных беталактамных антибиотиков в значительном количестве образовывал летучие вещества с неприятным запахом гниющих овощей.

Мутации, ведущие к удалению генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе этих летучих веществ, приобрели в данном случае практическое значение для производства.

Из всего изложенного следует, что современный биообъект, используемый в биотехнологической промышленности, — это суперпродуцент, отличающийся от исходного природного штамма не по одному, а, как правило, по нескольким показателям. Хранение таких штаммов-суперпродуцентов представляет серьезную самостоятельную проблему. При всех способах хранения их необходимо периодически пересевать и проверять как на продуктивность, так и на другие важные для производства свойства.

В случае применения высших растений и животных в качестве биообъектов для получения лекарственных средств возможности использования мутагенеза и селекции для их совершенствования ограничены. Однако в принципе мутагенез и селекция здесь не исключены. Особенно это относится к растениям, образующим вторичные метаболиты, которые используются как лекарственные вещества.

1.3. Совершенствование биообъектов методами клеточной инженерии

В течение многих лет мутагенез и селекция успешно применялись и будут широко применяться при совершенствовании биообъектов в дальнейшем.

Однако постепенно были выявлены существенные ограничения в достижении ставящихся биотехнологами целей. И, хотя главный путь снятия таких ограничений связан с применением методов генетической инженерии, определенные перспективы имеет и клеточная инженерия — «насилованный» обмен участками хромосом у прокариот или участками и даже целыми хромосомами у эукариот. В результате создаются неприродные биообъекты, среди которых могут быть отобраны продуценты новых веществ или организмы с ценными в практическом отношении свойствами.

Перспективы клеточной инженерии заключаются прежде всего в том, что с ее помощью возможно получение межвидовых и межродовых гибридных культур микроорганизмов, а также гибридных клеток между отдаленными в эволюционном отношении многоклеточными организмами. Далее необходимо сделать оговорку, что материал, относящийся к получению гибридов между лимфоцитами и опухолевыми клетками излагается в гл. 10. В данной главе техника клеточной инженерии рассматривается применительно к микроорганизмам и в соответствии с теми целями, которые ставятся перед ними как биообъектами. В качестве наиболее простого примера можно взять микроорганизмы прокариот (с одной хромосомой в клетке).

Для обмена фрагментами хромосомы у прокариот необходимо предварительно получить из их клеток лишенные клеточной стенки протопласты; затем осуществить слияние (фузию) протопластов с образованием диплоидов; полученные диплоиды инкубировать в течение нескольких часов для «ломки» и воссоединения кольцевых хромосомных нитей в разных вариантах. Затем суспензию протопластов высевают на твердую питательную среду, при этом часть диплоидов превращается в гаплоиды — способные к размножению клетки, которые образуют соответственно колонии. Их изучают и отбирают культуры, приобретающие новые качества, представляющие интерес для биотехнолога (рис. 2).

Таким образом, первый этап работы связан с удалением у микроорганизмов клеточной стенки. У прокариот — эубактерий и актиномицетов — многоклеточных бактерий клеточная стенка состоит из жесткого полимера пептидогликана, поддерживающего форму клетки и обеспечивающего защиту цитоплазматической мембраны от перепада осмотического давления между внешней средой и цитоплазмой.

Пептидогликан может быть расщеплен с помощью ферментов (гидролаз пептидогликана), из которых самым известным является лизоцим, расщепляющий полисахаридные нити пептидогликана. Источником лизоцима как лабораторного реагента является белок куриного яйца.

Ферментативная деградация клеточной стенки в обычных условиях культивирования бактерий сразу же ведет к их лизису из-за

разницы в осмотическом давлении. При этом ни цитоплазматическая, ни внешняя (у грамотрицательных бактерий) мембраны не выдерживают целостности. Этим давно известным явлением объясняется, например, литический эффект пенициллина, который, подавляя синтез пептидогликана, нарушает баланс между действием его синтетаз и гидролаз.

Из изложенного следует, что удалить клеточную стенку и в то же время сохранить целостность мембраны протопласта можно, лишь выровняв осмотическое давление внутри клетки и в среде. Этот простой путь тем не менее долгое время оставался неизвестным, пока Дж. Ледерберг не показал его реальность. С тех пор работы по клеточной инженерии микроорганизмов базируются на протопластировании: для получения протопластов клеточную стенку

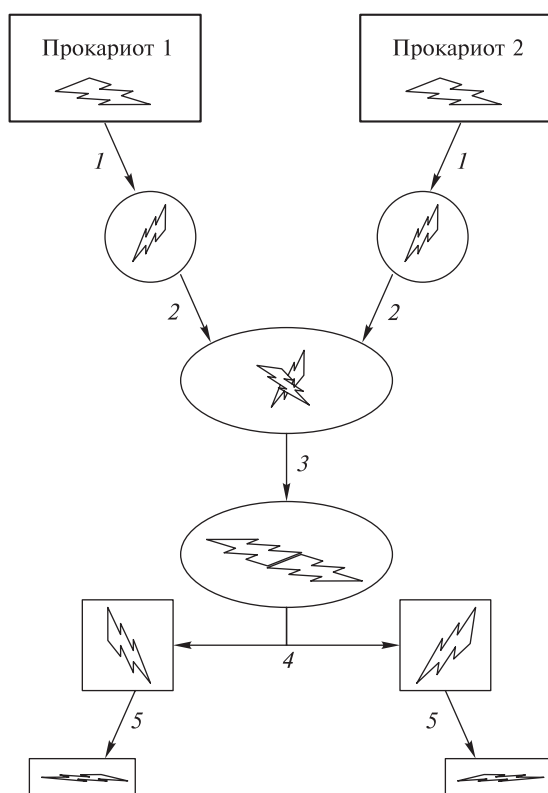


Рис. 2. Формирование протопластов у прокариот:

1 — ферментативная деградация клеточной стенки; 2 — слияние протопластов; 3 — ломка и рекомбинация хромосом, образование диплоидов; 4 — образование гаплоидов с рекомбинантной хромосомой; 5 — регенерация протопластов

ку удаляют ферментативной обработкой в «гипертонической» среде с 20 % раствором сахарозы или маннита, иногда с 10 % раствором натрия хлорида в зависимости от определенных особенностей биообъекта и преследуемых целей. Превращение суспензии клеток в суспензию протопластов обычно контролируют методом фазово-контрастной микроскопии.

Если биообъект принадлежит к микроскопическим (плесневым и дрожжевым) грибам, то для получения протопластов используют, как правило, не лизоцим, а комплексный ферментный препарат, выделенный из пищеварительного тракта виноградной улитки *Helix pomatia*. Связано это с тем, что состав клеточной стенки у грибов более сложен, чем у бактерий. Она состоит из таких полимеров, как хитин, глюканы, маннопротеин, для каждого из которых необходим свой, деградирующий его фермент. Известно, что по набору ферментов и их каталитической активности наиболее эффективен желудочный сок виноградной улитки в ранний весенний сезон, когда улитки появляются на виноградных плантациях, но их желудок еще не заполнен перевариваемыми виноградными листьями. Неочищенный экстракт из пищеварительного тракта виноградной улитки лиофильно высушивают и используют как комплексный ферментный препарат для получения протопластов из клеток грибов.

Следующий этап работы состоит в объединении суспензий двух образцов протопластов, принадлежащих разным штаммам или разным видам, в более редких случаях — даже разным родам. Добиться слияния двух протопластов разного происхождения — довольно сложная задача. Частота слияния резко повышается при добавлении к протопластам полиэтиленгликоля, обладающего свойствами детергента. В случае прокариот образующиеся протопласты имеют двойной набор хромосомного материала, т.е. это протопласты с двумя хромосомами. В гипертонической среде такие протопласты сохраняют свою целостность.

После промывания гипертонической средой, но уже не содержащей гидролизующего клеточную стенку ферментного препарата, протопласты высеиваются на твердую питательную среду. При этом у определенной части протопластов диплоидные формы переходят в гаплоидные; в результате образуются способные к размножению нормальные клетки с клеточной стенкой. Эти клетки формируют на твердой среде колонии. Однако во время нахождения протопластов в диплоидной форме в некоторых из них происходит «ломка» и воссоединение хромосомных нитей, при котором в одну хромосому может включиться фрагмент другой. Таким образом, при регенерации протопластов формируются нормальные клетки, часть которых имеет гибридные хромосомы. Культуры таких клеток обладают новыми свойствами. В качестве примера можно привести получение «гибридных» антибиотиков.