



В 8-ми книгах

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Под редакцией Н.С.Егорова
В.Д.Самуилова

Н.С.Егоров
А.В.Олескин
В.Д.Самуилов

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ



Москва «Высшая школа» 1987

ББК 30.6
Б63
УДК 574.6

Рецензенты:

кафедра микробиологии Казанского государственного университета им. В. И. Ульянова-Ленина (зав. кафедрой проф. И. Б. Лещинская) и член-кор. АН СССР И. В. Березин (ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР)

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебного пособия для студентов биологических специальностей высших учебных заведений

Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн./Под
Б63 ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 1: Проблемы и
перспективы/Н. С. Егоров, А. В. Олескин, В. Д. Самуи-
лов. — М.: Высш. шк., 1987. —159 с.: ил.

Излагаются различные этапы осуществления биотехнологического процесса — подготовка биотехнологических объектов с заданными свойствами, выбор и подготовка сырья как ростового субстрата, культивирование, выделение, очистка и модификация продуктов жизнедеятельности, иммобилизация клеток и ферментов. Рассматривается вклад биотехнологии в решение проблем сельского хозяйства, здравоохранения, энергетики, охраны окружающей среды, пищевой промышленности, потребностей науки.

Б 2910000000(4309000000)—290 223—87
001(01)—87

ББК 30.6 + 28.07
605

ПРЕДИСЛОВИЕ

В наши дни человек не только использует продукты жизнедеятельности организмов, но и управляет внутриклеточными процессами, осуществляет направленную модификацию свойств организмов на основе методов генетической и клеточной инженерии. В последние десятилетия существенно расширился список ценных биотехнологических продуктов. В биотехнологии видят одно из средств для преодоления продовольственных, энергетических, сырьевых и экологических проблем.

Большое значение, которое придается биотехнологии в нашей стране, обуславливает необходимость подготовки достаточного количества квалифицированных кадров. В то же время до сих пор не существует отечественного учебного пособия, в компактной форме рассматривающего биотехнологию как отрасль современного знания. Настоящая книга открывает серию учебных пособий, посвященных основным аспектам современной биотехнологии: «Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов» (В. Г. Дебатов, В. А. Лившиц), «Клеточная инженерия» (Р. Г. Бутенко и др.), «Автоматизация биотехнологических исследований» (Д. В. Зудин и др.), «Производство белковых веществ» и «Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов» (В. А. Быков и др.), «Иммобилизованные ферменты» и «Инженерная энзимология» (И. В. Березин и др.).

В данном учебном пособии очерчены горизонты биотехнологии: рассмотрены области ее приложения, задачи, которые она способна решить, перспективы использования нетрадиционных биотехнологических разработок, проблемы и трудности, связанные с их реализацией. Учебное пособие включает введение, в котором рассмотрены перспективы и проблемы современной биотехнологии. Далее излагаются материалы по отдельным этапам осуществления биотехнологических процессов: подготовка биологических объектов с заданными свойствами, проблемы сырья как ростового субстрата, культивирование организмов, выделение, очистка и модификация продуктов, а также иммобилизация клеток и ферментов. Обсуждаются перспективы и проблемы, связанные с каждым из этих этапов. Рассматриваются приложения биотехнологии к растениеводству, животноводству, энергетике, медицине, пищевой промышленности, добыче полезных ископаемых, охране окружающей среды.

Учебное пособие предназначено для студентов-биологов, химиков и технологов, а также для широкого круга читателей, интересующихся состоянием и перспективами развития биотехнологии.

Авторы

С древних времен известны отдельные биотехнологические процессы, используемые в различных сферах практической деятельности человека. К ним относятся хлебопечение, виноделие, приготовление кисло-молочных продуктов и т. д. Однако биологическая сущность этих процессов была выяснена лишь в XIX в., благодаря работам Л. Пастера. В первой половине XX в. сфера приложения биотехнологии пополнилась микробиологическим производством ацетона и бутанола, антибиотиков, органических кислот, витаминов, кормового белка.

Немаловажный вклад в биотехнологические разработки внесли советские исследователи: в СССР в 30-е годы были построены первые заводы по получению кормовых дрожжей на гидролизатах древесины, сельскохозяйственных отходах и сульфитных щелоках, под руководством В. Н. Шапошникова успешно внедрена технология микробиологического производства ацетона и бутанола. Большую роль в создание основ отечественной биотехнологии внесло учение Шапошникова о двухфазном характере брожения. В 1926 г. в СССР были исследованы биоэнергетические закономерности окисления углеводов микроорганизмами. В последующие годы биотехнологические разработки широко использовались в нашей стране для расширения «ассортимента» антибиотиков для медицины и животноводства, ферментов, витаминов, ростовых веществ, пестицидов.

С момента создания в 1963 г. Всесоюзного научно-исследовательского института биосинтеза белковых веществ в нашей стране налаживается крупнотоннажное производство богатой белками биомассы микроорганизмов как корма. В 1966 г. микробиологическая промышленность была выделена в отдельную отрасль (Главное управление микробиологической промышленности при Совете Министров СССР — Главмикробиопром). Имеются ценные разработки по получению новых источников энергии биотехнологическим путем (технологическая биоэнергетика), отметим большое значение биогаза — заменителя топлива, получаемого из недр земли.

Значительные успехи, достигнутые во второй половине XX в. в фундаментальных исследованиях в области биохимии, биорганической химии и молекулярной биологии, создали предпосылки для управления элементарными механизмами жизнедеятельности клетки, что явилось мощным импульсом для развития биотехнологии. Выяснение роли нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации, расшифровка генетического кода, раскрытие механизма индукции и репрессии генов, совершенствование технологии культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений и животных позволили разработать методы

генетической и клеточной инженерии, с помощью которых можно искусственно создавать новые формы высокопродуктивных организмов. Генетическая и клеточная инженерия рассматривается как принципиально новое направление биологической науки, которое сегодня ставят в один ряд с расщеплением атома, преодолением земного притяжения и созданием средств электроники (Ю. А. Овчинников, 1985).

В разработку генноинженерных методов советские исследователи включились в 1972 г. Следует указать на успешное осуществление проекта «Ревертаза» — получение в промышленных масштабах обратной транскриптазы в СССР.

С 1970 г. в нашей стране ведутся интенсивные исследования по селекции культур для непрерывного культивирования в промышленных целях.

Развитие методов для изучения структуры белков, выяснение механизмов функционирования и регуляции активности ферментов открыли путь к направленной модификации белков и привели к рождению инженерной энзимологии. Имобилизованные ферменты, обладающие высокой стабильностью, становятся мощным инструментом для осуществления каталитических реакций в различных отраслях промышленности.

Все эти достижения поставили биотехнологию на новый уровень, качественно отличающийся от прежнего возможностью сознательно управлять клеточными процессами. В современном звучании биотехнология — это *промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами*. Биотехнология — междисциплинарная область научно-технического прогресса, возникшая на стыке биологических, химических и технических наук.

Биотехнологический процесс включает ряд этапов: подготовку объекта, его культивирование, выделение, очистку, модификацию и использование продуктов. Многоэтапность процесса обуславливает необходимость привлечения к его осуществлению самых различных специалистов: генетиков и молекулярных биологов, биохимиков и биооргаников, вирусологов, микробиологов и клеточных физиологов, инженеров-технологов, конструкторов биотехнологического оборудования и др.

В Комплексной программе научно-технического прогресса стран — членов СЭВ в качестве первоочередных задач биотехнологии определены создание и широкое народнохозяйственное освоение:

— новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормонов роста человека, моноклональных антител и т. д.), позволяющих осуществить в здравоохранении раннюю диагностику и лечение тяжелых заболеваний — сердечно-сосудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных;

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

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

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

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

По оценкам специалистов, мировой рынок биотехнологической продукции уже к середине 90-х годов достигнет уровня 130—150 млрд. руб. (Ю. А. Овчинников, 1985).

На пути решения поставленных задач биотехнологию подстерегают немалые трудности, связанные с исключительной сложностью организации живого. Любой биообъект — это целостная система, в которой нельзя изменить ни один из элементов, не меняя остальных, нельзя произвольно перекомбинировать их, придавая организму то или иное желаемое свойство, например бактерии — способность к сверхсинтезу требуемой аминокислоты, сельскохозяйственному растению — устойчивость к фитопатогенным грибкам. Любое воздействие на объект вызывает не только желаемые, но и побочные эффекты; перестройка генома сказывается сразу на многих признаках организма. У человека существуют гены, отвечающие за злокачественное перерождение клеток. Высказывалось немало идей о необходимости превентивных генетических операций, пока не было установлено, что эти гены необходимы и для нормального роста. Помимо этого, экосистема также представляет собой целостную систему и изменения каждого из ее компонентов сказываются на остальных компонентах. Не исключено, что плазида, с помощью которой трансплантирован желаемый ген культурному растению, будет далее передаваться сорнякам. Не будет ли в результате генных манипуляций превращаться в сорняк само культурное растение (Н. Hauptli, 1984)?

Успехи, достигнутые в области генетической и клеточной инженерии на простейших биологических системах, прокариотных организмах, вселяют уверенность в преодолимость рассмотренных трудностей. Что касается более сложных систем, а именно эукариотных организмов, то здесь делаются лишь первые шаги, идет накопление фундаментальных знаний.

§ 1. Подбор объектов

Главным звеном биотехнологического процесса, определяющим его сущность, является клетка. Именно в ней синтезируется целевой продукт. По образному выражению Ю. А. Овчинникова (1985), клетка представляет собой миниатюрный химический завод, работающий с колоссальной производительностью, с предельной согласованностью и по заданной программе. В ней ежеминутно синтезируются сотни сложнейших соединений, включая гигантские биополимеры, в первую очередь белки.

Основа современного биотехнологического производства — микробиологический синтез, т. е. синтез различных веществ с помощью микроорганизмов. Объекты растительного и животного происхождения еще не нашли широкого применения вследствие их высокой требовательности к условиям культивирования, в значительной степени удорожающей производство.

Независимо от природы объекта, начальным этапом биотехнологической разработки является получение чистых культур клеток и тканей (рис. 1). Дальнейшие этапы манипуляции с этими культурами характеризуются единообразием подходов, основанных на классических методах микробиологии. В этом смысле культуры клеток и тканей растений и животных уподобляются культурам микроорганизмов.

Велик и многообразен мир микробов. К ним относятся все прокариоты — бактерии, актиномицеты, риккетсии и часть эукариот — дрожжи, нитчатые грибы, простейшие и водоросли. Их общее свойство — малые размеры, вследствие чего они видимы лишь в микроскоп. В настоящее время известно более 100 тыс. различных видов микроорганизмов. Многих еще предстоит выявить. При столь большом разнообразии микроорганизмов как провести правильный подбор именно тех форм, продукция которых нас интересует? Как отобрать продуцентов витамина В₁₂ или треонина, эритромицина или декстрана, холестериноксидазы или метана?

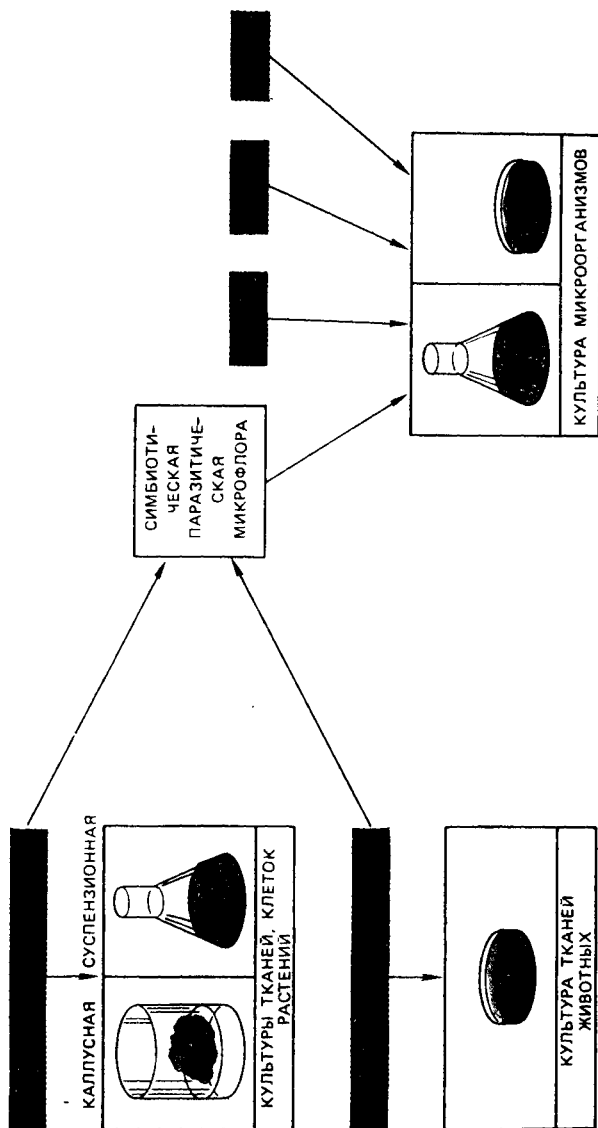


Рис. 1. Получение культур клеток микроорганизмов, клеток и тканей растений и животных
(по М. В. Гусеву, 1985)

Для решений подобных задач проводится выделение микроорганизмов. Отбираются пробы из мест, где обитание того или иного продуцента наиболее вероятно. Применительно к углеводородоокисляющим микроорганизмам таким местом может быть почва возле бензоколонок, винные дрожжи обильно встречаются на винограде, анаэробные целлюлозоразлагающие и метанобразующие микроорганизмы в больших количествах обитают в рубце жвачных животных. Образцы проб вносят в жидкие питательные среды специального состава. Эти среды называют селективными: в них путем варьирования различных факторов создаются избирательные условия для преимущественного развития интересующего нас продуцента. К этим факторам относятся источники энергии, углерода, азота, значения pH, температура, осмотическое давление и т. д. Для накопления продуцента холестериноксидазы используют среды с холестерином в качестве единственного источника углерода; углеводородоокисляющих микроорганизмов — среды с парафинами; продуцентов протеолитических или липолитических ферментов — среды, содержащие белки или липиды. Так получают *накопительные культуры* микроорганизмов.

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

Существует и другой путь подбора микроорганизмов — из имеющихся коллекций микроорганизмов. При этом руководствуются опытом, накопленным в результате изучения физиологии и биохимии различных групп микроорганизмов: продуцентов антибиотиков чаще всего находят среди актиномицетов, внеклеточное выделение гидролитических ферментов характерно для грамположительных бактерий, типичные продуценты этанола — дрожжи и т. д.

Способность синтезировать целевой продукт является главным критерием при отборе продуцентов. Однако микробиологическая промышленность предъявляет к продуцентам ряд других требований, важных с точки зрения технологии производства. Микроорганизмы должны: 1) обладать высокой скоростью роста; 2) использовать для жизнедеятельности дешевые непищевые субстраты; 3) быть устойчивыми к заражению посторонней микрофлорой. Все это позволяет значительно снизить затраты на производство целевого продукта.

Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями синтетических процессов, чем высшие формы живого. Так, корова массой 500 кг в течение одних суток синтезирует около 0,5 кг белка. Такое же количество белка за одни сутки можно получить с помощью 5 г дрожжей. Столь

высокие скорости роста характерны, однако, не для всех микроорганизмов. Существуют так называемые *олиготрофные* микроорганизмы, растущие крайне медленно. Они мало изучены, но представляют значительный интерес как возможные продуценты различных веществ. Поэтому исследование факторов, регулирующих рост культур, оптимизация условий выращивания продуцентов имеют большое теоретическое и практическое значение в биотехнологии.

Особый интерес как объекты биотехнологических разработок представляют *фотосинтезирующие* микроорганизмы. Они используют в своей жизнедеятельности энергию света, синтезируют разнообразные вещества клеток в результате восстановления углекислоты, сопряженного с окислением воды (цианобактерии и эукариоты), способны к усвоению атмосферного азота (прокарриоты), т. е. обходятся самыми дешевыми источниками энергии, углерода, восстановительных эквивалентов и азота. Преимущества фотосинтетиков очевидны перед традиционными в настоящее время объектами биотехнологии — микроорганизмами, энергетические и конструктивные потребности которых обеспечиваются органическими соединениями. Фототрофные микроорганизмы перспективны как продуценты аммиака, водорода, белка и различных биопрепаратов. Большое будущее ожидает фотосинтетиков на пути генетической инженерии в связи с созданием новых технологий микробиологического производства на основе биоконверсии солнечной энергии (С. В. Шестаков, 1984). Прогресс в этой области сдерживается недостатком фундаментальных знаний по генетике и молекулярной биологии фототрофов.

Выгодным объектом для биотехнологии являются *термофильные* микроорганизмы. Они оптимально растут при высоких температурах (60—80°C, отдельные представители до 110°C и выше, в подводных выбросах сверхгорячих вод на больших океанических глубинах найдены микроорганизмы, способные развиваться под давлением при температурах до 300°C), что затрудняет развитие посторонней микрофлоры. Среди термофилов обнаружены ценные продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Применение термофилов позволяет снизить затраты на стерилизацию промышленного оборудования. Кроме того, скорость роста и метаболическая активность у этих организмов в 1,5—2 раза выше, чем у мезофилов (температурный оптимум развития составляет 20—45°C). Ферменты, синтезируемые термофилами, в частности протеазы *Thermus caldophilus* или *T. aquaticus*, имеют высокую устойчивость к нагреванию, действию окислителей, детергентов, органических растворителей и другим неблагоприятным условиям. В то же время они малоактивны при нормальных температурах. Так, активность протеазы *T. caldophilus* при 20°C почти в 100 раз ниже, чем при 75°C. Это свойство имеет прикладное значение, например, в пищевой промышленности. И наконец, еще одно преимущество термофилов связано с затратами на охлаждение биореакторов.

Поскольку реактор для культивирования термофильных микроорганизмов действует при температурах, значительно превышающих температуру окружающей среды, высокий перепад температур способствует быстрой теплоотдаче. Это позволяет применять биореакторы без громоздких теплообменных устройств и тем самым упростить их конструкцию, облегчая аэрацию, перемешивание и пеногашение.

Выделение и подбор объекта — важный этап биотехнологического процесса. Однако путем простого подбора не удается получить высокоактивных продуцентов, поэтому возникает задача изменения природы организма в нужном направлении. Для этого используют методы селекции. С их помощью получены промышленные штаммы микроорганизмов, синтетическая активность которых превышает активность исходных штаммов в десятки и сотни раз.

§ 2. Селекция

Селекция — направленный отбор *мутантов*, т. е. организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение вследствие структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК. Генеральный путь селекции — это путь от слепого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов. Однако методы, основанные на отборе спонтанных мутаций, сыграли важную роль в развитии различных технологий с использованием микроорганизмов.

Таким путем за длительное время были отобраны штаммы пивных, винных, пекарских дрожжей, уксуснокислых, пропионовых бактерий и др. Речь по существу идет о ступенчатом отборе: на каждом из этапов из популяции микроорганизмов отбираются наиболее высокоэффективные клоны. Ограниченность метода селекции, основанного на спонтанных мутациях, связана с их низкой частотой, что значительно затрудняет интенсификацию процесса. Изменения в структуре ДНК происходят редко. Ген должен удвоиться в среднем 10^6 — 10^8 раз, чтобы возникла мутация.

Несмотря на это, возможности метода не исчерпаны. Высокие плотности микробных популяций, достигающие 10^9 клеток и более на 1 мл суспензии, в сочетании с непрерывным культивированием биообъекта в больших объемах на протяжении многих поколений позволяют получить достаточно большие количества мутантов. Примером отбора наиболее продуктивных мутантов при культивировании в непрерывном режиме является отбор дрожжей *Saccharomyces uvarum* по признаку устойчивости к этанолу, продукту жизнедеятельности дрожжей. Новизна этого подхода (S. Brown, S. Oliver, 1983), открывающего перспективы для повышения устойчивости биообъектов к самым различным факторам — кислотам и щелочам, продуктам метаболизма, ионам тяжелых металлов и др., — в установлении обратной свя-

зи между параметром, характеризующим жизнедеятельность культуры, — выделением ею CO_2 и поступлением ингибирующего фактора (в данном случае этанола) в биореактор. При продолжительном (650-часовом) культивировании в такой установке получены мутантные дрожжи, резистентные к ингибирующему действию этанола в концентрациях вплоть до 10%.

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

Проводят тотальную проверку (скрининг) полученных клонов. Отобрав наиболее продуктивные клоны, повторяют обработку тем же или другим мутагеном, вновь отбирают наиболее продуктивный вариант и т. д., т. е. и здесь речь идет о ступенчатом отборе по интересующему признаку.

Трудоемкость — основной недостаток метода индуцированного мутагенеза и последующего ступенчатого отбора. Недостатком метода является также отсутствие сведений о характере мутаций, исследователь проводит отбор по конечному результату. Так, если речь идет о штаммах бактерий, устойчивых к тяжелым металлам, то устойчивость может быть обусловлена мутациями различных типов: а) подавлением системы поглощения катионов металлов бактериальной клеткой; б) активацией выброса поглощенных катионов из клетки; в) перестройкой систем, чувствительных к ингибирующему действию тяжелых металлов.

Достижения молекулярной генетики позволили ввести в практику целенаправленные методы отбора продуцентов — *по их устойчивости к структурным аналогам целевого продукта*. Метод основан на регуляции ферментов по принципу обратной связи конечным продуктом биосинтетического пути (В. Г. Дебатов, 1984). Повышение концентрации метаболита ингибирует актив-

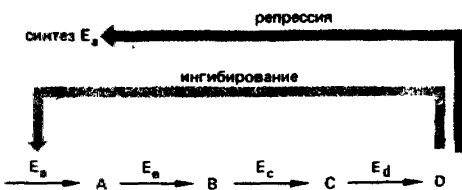


Рис. 2. Негативная регуляция биосинтетического пути конечным продуктом: А, В, С, D — продукты реакций, катализируемых ферментами E_a , E_b , E_c и E_d

ность фермента, участвующего в синтезе метаболита, или репрессирует синтез этого фермента (рис. 2). Так, при наличии глюкозы и NH_4^+ клетки многих бактерий синтезируют все необходимые для жизнедеятельности азотсодержащие соединения. Если в среду добавить ту или иную аминокислоту, то ее синтез

быстро прекращается. Такой же эффект вызывают структурные аналоги метаболита, которые, однако, не могут функционально заменить метаболит. Например, аналог аминокислоты не может войти в состав белка, поэтому в присутствии аналога рост нормальных клеток подавляется в связи с голоданием по целевому продукту.

В этих условиях выживают лишь некоторые клетки. Это мутанты с нарушенной регуляцией активности и синтеза ферментов. Интерес представляют те мутанты, у которых 1) фермент E_a (рис. 2) сохранил функциональную активность, но потерял чувствительность к ингибирующему действию конечного продукта или его аналога; 2) синтез фермента E_a устойчив к избытку продукта или его аналога. Мутации подобного типа ведут к появлению сверхпродуцентов, синтезирующих целевой метаболит в аномально высоких концентрациях.

Так, селекцию на клеточном уровне, направленную на повышение содержания незаменимых аминокислот у моркови, проводили путем отбора мутантных клеточных клонов, устойчивых к токсическим аналогам этих аминокислот. Резистентные к этионину клетки моркови синтезировали в 20 раз больше метионина, к 5-метилтриптофану — в 30 раз больше триптофана, к аминокислоте — в 5 раз больше лизина, чем исходные клетки (З. Б. Шамина, 1984).

Если необходимо добиться накопления не конечного, а промежуточного продукта биосинтетического пути (рис. 3), то это может быть достигнуто с помощью мутанта, у которого блокирован следующий за интермедиатом этап синтеза. Такой мутант ауксотрофен, т. е. растет только при добавлении в среду культивирования вещества, служащего продуктом блокированной реакции. Однако возможны супрессорные (компенсирующие) мутации, ведущие к активации альтернативных путей синтеза недостающих соединений. Ревертировавшие к дикому типу особи не нуждаются в добавлении вещества D и в то же время характеризуются сверхсинтезом вещества C.

Таким образом, этот путь селекции основан на переходе от прототрофных к ауксотрофным по определенному соединению штаммам. В некоторых случаях приходится решать обратную задачу: осуществить переход от ауксотрофов к прототрофам. Например, в норме растительные клетки в культуре не растут без добавления фитогормонов (ауксинов, цитокининов). Однако в последние годы выделены клоны растительных клеток, превращающих триптофан в индолацетамид и далее в индолуксусную кислоту, природный гормон типа ауксина. Некоторые из полученных мутантов способны также

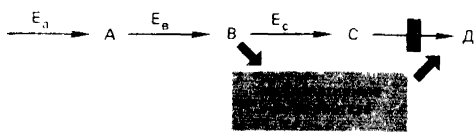


Рис. 3. Блокирование промежуточной реакции биосинтетического пути с целью получения сверхпродуцента (обозначения, как на рис. 2)

к синтезу зеатинрибозина, гормона типа цитокинина. Такие мутантные клоны клеток в природе порождают раковые опухоли растений, поскольку они размножаются бесконтрольно (D. von Wettstein, 1984). На основе таких клонов можно получить ценные соединения.

§ 3. Генетическая инженерия

Современную биотехнологию нередко характеризуют как биотехнологию на основе генетической инженерии. Действительно, это основной путь, используемый для направленной модификации биообъектов в результате введения искусственно созданных генетических программ.

Иногда различают три уровня генетической инженерии: 1) геномную — прямое манипулирование рекомбинантными ДНК, включающими отдельные гены; 2) хромосомную — манипуляции с большими группами генов или целыми хромосомами и 3) геномную — перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой. В современном понимании генетическая инженерия включает технологию рекомбинантных ДНК. Что касается двух других уровней генетических манипуляций, то геномная инженерия соответствует тому, что ныне принято обозначать как клеточная инженерия. Трансплантация хромосом и их фрагментов играет пока второстепенную роль как метод модификации биообъектов. Помимо этого, различать хромосомную и геномную инженерию можно было бы лишь в применении к эукариотам, у прокариот понятия «хромосома» и «геном» часто совпадают.

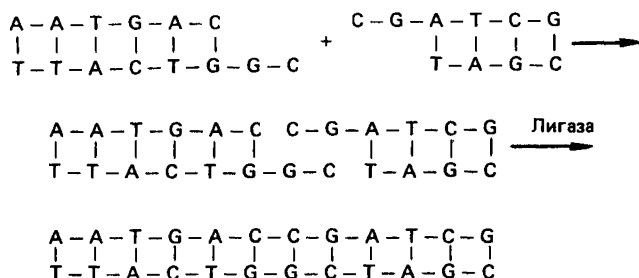
Работы в области генетической инженерии включают четыре основных этапа: 1) получение нужного гена; 2) его встраивание в генетический элемент (*вектор*), способный к репликации; 3) введение гена, входящего в состав вектора, в организм-реципиент; 4) идентификация (скрининг и селекция) клеток, которые приобрели желаемый ген (гены). Рассмотрим по отдельности каждый этап.

Получение генов. Получить нужный ген можно: а) выделением его из ДНК; б) путем химико-ферментативного синтеза; в) воссозданием на основе изолированной матричной РНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (ревертазы).

Выделение генов из ДНК. Изолированную ДНК подвергают фрагментации. Для этого используют рестрикционные эндонуклеазы (*рестриктазы*), катализирующие расщепление ДНК на участках, имеющих определенные последовательности нуклеотидов (обычно длиной в 4—7 нуклеотидных пар). К настоящему времени известно более 400 рестриктаз, которые узнают 85 различных нуклеотидных последовательностей.

Расщепление может происходить по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар, и тогда обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты имеют двунитевые (тупые) концы. Другие рестриктазы расщепляют нити ДНК со

сдвигом, так что образуется ступенька — одна из нитей ДНК выступает на несколько нуклеотидов. Образуются односторонние (липкие) концы. Если встречаются два липких фрагмента ДНК, полученных действием одной и той же рестриктазы, то в силу комплементарности концевых последовательностей они легко вступают во взаимодействие:



При необходимости тупые концы могут быть превращены в липкие. Для этого к тупым концам присоединяют двухцепочечные последовательности (линкеры) с участками узнавания рестриктазы, дающей липкие концы (рис. 4). Нуклеотидная последовательность с липкими концами может быть: а) присоединена к вектору, предварительно обработанному той же рестриктазой, и б) превращена из линейной молекулы в кольцевую путем сшивания взаимно комплементарных концов.

Метод выделения генов из ДНК с помощью рестриктаз имеет существенные недостатки (Л. Л. Киселев, 1984). Трудно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, который соответствует нужному гену. Наряду с интересующим геном фрагменты ДНК, как правило, включают лишние нуклеотидные последовательности, создающие помехи для

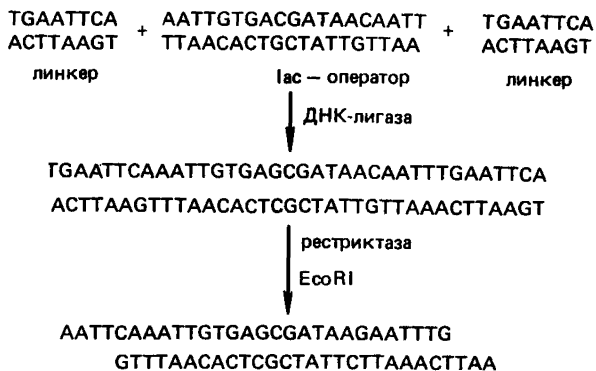


Рис. 4. Подготовка фрагмента ДНК (*lac*-оператора *E. coli*) к встраиванию в состав генетического вектора (плазмиды).
(По Г. Бойеру и др., 1980)

использования гена. Рестриктаза может отщепить часть нуклеотидной последовательности гена, в результате чего ген теряет функциональную полноценность.

Гены эукариотных организмов имеют сложное строение: включают кодирующие белок, значащие (экзоны) и промежуточные, незначащие участки (интроны). Первичная РНК, синтезированная на такой ДНК-матрице, подвергается модификации (*сплайсингу*), в результате чего участки, соответствующие интронам, удаляются, а участки, соответствующие экзонам, соединяясь, образуют зрелую матричную РНК. Наличие интронов является препятствием для нормального функционирования трансплантированных генов.

При обработке ДНК рестриктазами образуется смесь фрагментов. Непростая задача — выделить из этой смеси именно те фрагменты, которые несут нужный ген. Бактериальная клетка содержит около 5 тыс. генов, а эукариотная клетка — от 10 до 200 тыс. (К. Г. Газарян, В. З. Тарантул, 1983).

Химико-ферментативный синтез генов. Этот метод — важная альтернатива «вырезанию» генов с помощью рестриктаз из нативной ДНК. Метод включает химический синтез коротких (8—16-звенных) одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов между собой посредством ДНК-лигазы с образованием двухцепочечных полинуклеотидов.

Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать минимально необходимую последовательность нуклеотидов и избежать проблем, связанных с элиминированием лишних нуклеотидных последовательностей в фрагментах ДНК, в том числе интронов. Кроме того, имеется возможность введения в гены участков узнавания различных рестриктаз, регуляторных последовательностей и т. д.

Для химико-ферментативного синтеза генов необходима полная информация о его нуклеотидной последовательности, поэтому применимость метода ограничена возможностями получения такой информации. Последовательность нуклеотидов в гене может быть воссоздана на основе первичной структуры соответствующего белка. Триумф в анализе структуры гена — параллельное воссоздание нуклеотидной последовательности ДНК и цепочки аминокислотных остатков в кодируемом белке. Методом химико-ферментативного синтеза получены гены соматостатина, А- и В-цепей инсулина, проинсулина, *lac*-оператор *E. coli* и др.

Ферментативный синтез генов на основе выделенной из клетки матричной РНК (мРНК). Это наиболее популярный метод синтеза генов. Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, комплементарной мРНК. Полученную одноцепочечную ДНК, называемую комплементарной ДНК или кДНК, используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с применением ДНК-полимеразы или ревертазы.

Преимущество рассматриваемого метода состоит в том, что ген получается без интронов и других нетранскрибируемых последовательностей. Помимо этого, легче создать условия, когда клетка аккумулирует нужный вид мРНК, чем отбирать ген из смеси фрагментов ДНК. Большим успехом в применении метода, основанного на РНК-зависимом синтезе ДНК, является получение в 1979 г. гена гормона роста человека (соматотропина).

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

Конструирование рекомбинантных ДНК осуществляется *in vitro*. Кольцевая молекула вектора размыкается рестриктазой. Необходимо, чтобы полученная линейная молекула ДНК содержала липкие концы, комплементарные концам вводимой ДНК. Комплементарные липкие концы вектора и вводимого гена сшиваются ДНК-лигазой и полученную рекомбинантную ДНК с помощью той же ДНК-лигазы вновь замыкают с образованием единой кольцевой молекулы (рис. 5).

Различают два основных класса векторов: вирусы и плазмиды. Важной проблемой, возникающей при использовании вирусов в качестве генетических векторов, является их аттенюация — ослабление патогенности для хозяина, чтобы зараженные вирусом клетки выживали и могли передать потомству измененную генетическую программу. Большое значение для биотехнологии имеет способность вирусов быстро транспортироваться из клетки в клетку, распространяясь по растительной или животной ткани так, что в короткие сроки развивается генерализованная инфекция по всему организму. Такое свойство вирусов открывает возможность генетической модификации соматических клеток взрослого организма. В этом отношении открываются перспективы лечения наследственных заболеваний человека путем введения вирусов, разносящих недостающие гены по всем $\sim 10^{11}$ клеткам человеческого тела.

Плазмиды — автономные самореплицирующиеся генетические единицы, найдены у бактерий, грибов, растений и животных. Наибольшее применение в генетической инженерии нашли бактериальные плазмиды, особенно плазмиды *E. coli*.

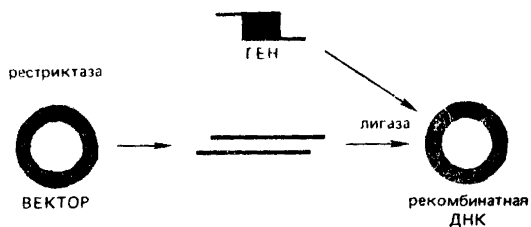


Рис. 5. Встраивание изолированного гена в генетический вектор

Бактериальные плазмиды подразделяются на конъюгативные, т. е. способные к переносу генетической информации от клетки к клетке путем конъюгации бактерий, и неконъюгативные, передающиеся от одной клетки к другой посредством механизма бактериальной трансформации. Перенос неконъюгативных плазмид путем конъюгации возможен только в том случае, если имеется плазида-помощник, способная к самостоятельному транспорту. Некоторые плазмиды способны к амплификации, т. е. образуют в клетке большое число копий, что резко повышает уровень фенотипического выражения генов.

При конструировании векторов исследователь вводит в него участки узнавания рестриктаз, а также гены-маркеры, кодирующие легко распознаваемые признаки. По этим признакам можно отобрать клетки, являющиеся носителями вектора.

Большой интерес представляют *космиды* — плазмиды, в состав которых введен *cos*-участок ДНК фага λ *E. coli*, отвечающий за упаковку ДНК в фаговую частицу. Такие плазмиды способны передавать очень большой объем генетической информации (до 10 тыс. пар азотистых оснований), рекомбинантные ДНК могут быть упакованы в фаговые частицы.

Применительно к генетической инженерии растений перспективны плазмиды бактерий родов *Rhizobium* и *Agrobacterium*. *Agrobacterium tumefaciens* содержит так называемые Ti (tumor-inducing — опухолеродные)-плазмиды, T-участок ДНК плазмид может встраиваться в геном растений некоторых видов. К числу таких видов растений принадлежат крестоцветные, а также представитель однодольных *Asparagus officinalis*, что открывает перспективы трансформации злаков с использованием Ti-плазмид (D. von Wettstein, 1984). Ti-плазмиды содержат три гена (онкогены), два из которых кодируют стадии синтеза ауксина, а третий отвечает за синтез цитокинина. Рост нормальных клеток растений регулируется поступлением этих гормонов извне. Клетки, содержащие T-участок Ti-плазмиды в интегрированном состоянии, размножаются бесконтрольно, образуя наросты — злокачественные опухоли. Плазмиды могут быть «обезоружены» вырезанием у них онкогенов. Вставка в T-участок гена, кодирующего желаемый продукт, ведет к превращению плазмид в полезный вектор для генетической инженерии. Ti-плазмиды индуцируют в зараженных клетках синтез аномальных аминокислот — производных аргинина: октопина и нопалина, называемых вместе опинами (В. И. Нерпук, 1984). Способность к синтезу опинов является полезным генетическим маркером. *Agr. rhizogenes* содержит Ri (root-inducing — индуцирующие образование корневых волосков)-плазмиды, которые в клетках растений тоже индуцируют синтез опинов. Как в Ti-, так и в Ri-плазмиды можно встроить длинные нуклеотидные последовательности, что позволяет транспортировать в клетки растений значительные количества генетической информации.

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

Трансформация — это перенос свободной ДНК, в том числе и плазмидной, в реципиентную клетку, вызывающий изменение признаков клетки. При этом происходят рекомбинация и интегрирование одонитевого фрагмента ДНК в хромосому реципиента или какую-либо внехромосомную генетическую единицу. Трансформация может вызывать ДНК бактерий; впервые это наблюдал Гриффит у пневмококков (1926).

Проникновение ДНК в клетку бактерии требует ее компетентного, т. е. восприимчивого, состояния. У представителей *Streptococcus* и *Pneumococcus* выделены и очищены факторы компетентности — белки с молекулярной массой 5—10 мД. Компетентность клетки определяется также условиями внешней среды. У *E. coli* и *B. subtilis* эффективная трансформация достигается обработкой клеток CaCl_2 и полиэтиленгликолем (ПЭГ).

Генетический материал, проникающий в клетку, может быть атакован внутриклеточными нуклеазами. В этой связи успешной трансформации способствует: 1) подавление активности или синтеза нуклеаз (трансформация клеток *E. coli* с высокой эффективностью была проведена при использовании мутантов, дефектных по нуклеазам) и 2) включение трансформирующей ДНК в липосомы — искусственные мембранные липидные везикулы.

Для проведения трансформации растений и грибов, в частности дрожжей, необходимо получение интактных протопластов. При трансформации протопластов дрожжей с помощью химерных плазмид, сочетающих плазмиду ColEI *E. coli* и ген LEU2 дрожжей, в присутствии ПЭГ и CaCl_2 клетки приобретали способность синтезировать лейцин. Аналогичным способом получены дрожжи, устойчивые к антибиотику тетрациклину. Ti- и Ri-плазмиды *Rhizobium* и *Agrobacterium* трансплантируются в протопласты растительных клеток путем трансформации. Совместное культивирование протопластов растений (петунии) и *Agrobacterium tumefaciens* ведет к необычайно высокоэффективной трансформации растительных клеток. Клетки растений могут быть трансформированы генетическим материалом вирусов при включении в фосфатидилсеринхолестериновые липосомы в присутствии ПЭГ и CaCl_2 .

Трансформация представляет собой наиболее универсальный путь передачи генетической информации, она имеет наибольшее значение для генетической инженерии. Конъюгацию и трансфекцию можно рассматривать как варианты трансформации, осложненной наличием специальных приспособлений для эффективного переноса генов.

Путем *конъюгации* происходит перенос лишь некоторых плаз-

мид (конъюгативных). В этом случае информация перекочевывает из одной клетки бактерии (мужской, донорной) в другую клетку (женскую, реципиентную) по половым ворсинкам, представляющим собой белковые трубочки. Хотя круг плазмид, самостоятельно осуществляющих конъюгативный перенос, ограничен, неконъюгативные плазмиды также могут передаваться путем конъюгации при участии плазмид - помощников.

Под *трансфекцией* понимают передачу всего набора генов вируса или фага, приводящую к развитию вирусных частиц в клетке. В генетической инженерии методика проведения трансфекции включает в приложение к бактериям получение сферопластов, очистку среды инкубации от внеклеточных нуклеаз и добавление очищенной ДНК того или иного фага в сочетании с протаминсульфатом, значительно повышающим эффективность трансфекции. Для стабилизации сферопластов добавляют спермин и другие полиамины (З. Б. Шабарова и др., 1980). Трансфекция клеток растений и животных соответствующими векторами вирусной природы может быть проведена как при использовании очищенной ДНК и протопластов, так и при заражении целых многоклеточных организмов (в этом случае чаще говорят не о трансфекции, а об инфекции) вирусными частицами или их ДНК. В последние годы сконструированы многочисленные челночные векторы, способные к репликации в животной и бактериальной клетке и поддерживающие эффективный синтез клонируемого гена в животной клетке.

Идентификация клеток-реципиентов, которые приобрели желаемый ген (гены). После трансформации, конъюгации или трансфекции необходимо идентифицировать клетки, несущие ген-мишень. Успех генноинженерного проекта часто зависит от эффективности использованного метода отбора. Значение этого этапа генноинженерной разработки становится очевидным, если учесть тот факт, что после трансплантации генов, как правило, лишь небольшая часть клеток содержит необходимый ген. Отбор клеток проводят в две стадии.

Первая стадия — отбор клеток, несущих соответствующий вектор (послуживший для трансплантации гена). Чаще всего такой отбор проводится по генетическим маркерам, которыми помечен вектор. Так, детерминанты устойчивости к антибиотикам на векторе позволяют обогатить бактериальную популяцию клетками, содержащими этот вектор, при их высеве на среду с антибиотиком.

Вторая стадия — поиск клеток, несущих не только вектор, но и ген-мишень. Для этого используют две группы методов.

1. Методы, основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов: а) определение нуклеотидной последовательности ДНК; из клеток, предположительно содержащих искомый ген, выделяют ДНК вектора, в которой проводится поиск участков, несущих этот ген; затем проводят секвенирование (как правило, части) нуклеотидной последовательности гена; б) гиб-

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

2. Методы, основанные на идентификации признака, кодируемого геном: а) непосредственный отбор клеток, синтезирующих белок — продукт транскрипции и трансляции гена-мишени, или клеток, образующих соединение, в синтезе которого участвуют ферменты, кодируемые геном, — так отбирали дрожжи, синтезирующие гистидин, из популяции клеток, трансформированных смесью химерных плазмид; б) использование селективных сред, поддерживающих рост только тех клеток, которые получили ген-мишень; например, клетки-реципиенты, несущие ген β -галактозидазы (фермент, необходимый для утилизации лактозы), могут быть отобраны путем выращивания бактериальных клеток на среде с лактозой в качестве единственного источника углерода; в) иммунологическая детекция: применяется, если искомым ген в составе рекомбинантной ДНК транскрибируется и транслируется, но никак не влияет на фенотип организма; например, если ген кодирует α -интерферон человека, бактериальные клетки лигируют, а затем проводят реакцию связывания антигена с антителами к α -интерферону.

Иногда возникает необходимость идентификации гена до встраивания в вектор или в составе вектора, но вне клеток-реципиентов. В этом случае используют бесклеточную систему сопряженной транскрипции-трансляции и с помощью специфических антител идентифицируют ген по его белковому продукту (Л. Л. Киселев, 1984).

Генетическая инженерия и конструирование новых организмов-продуцентов. С помощью методов генетической инженерии можно конструировать по определенному плану новые формы микроорганизмов, способных синтезировать самые различные продукты, в том числе продукты животного и растительного происхождения (Н. С. Егоров, В. Д. Самуилов, 1985). При этом следует учитывать высокие скорости роста и продуктивность микроорганизмов, их способность к утилизации разнообразных видов сырья. Широкие перспективы перед биотехнологией открывает возможность микробиологического синтеза белков человека: таким способом получены соматостатин, интерфероны, инсулин, гормон роста.

Основные проблемы на пути конструирования новых микроорганизмов-продуцентов сводятся к следующему.

1. Продукты генов растительного, животного и человеческого происхождения попадают в чуждую для них внутриклеточную среду, где они подвергаются разрушению микробными протеазами. Особенно быстро, за несколько минут, гидролизуются короткие пептиды типа соматостатина. Стратегия защиты генноинже-

нерных белков в микробной клетке сводится к: а) использованию ингибиторов протеаз; так, выход человеческого интерферона возрастал в 4 раза при введении в плазмиду, несущую интерфероновый ген, фрагмента ДНК фага T4 с геном *pin*, отвечающим за синтез ингибитора протеаз (В. И. Танышин, 1985); б) получению интересующего пептида в составе гибридной белковой молекулы, для этого ген пептида сшивают с природным геном организма-реципиента; чаще всего используют ген *lac*-оперона *E. coli* или ген белка *A Staphylococcus aureus*; в) амплификации (увеличению числа копий) генов; многократное повторение гена человеческого проинсулина в составе плазмиды привело к синтезу в клетке *E. coli* мультимера этого белка, который оказался значительно стабильнее к действию внутриклеточных протеаз, чем мономерный проинсулин. Проблема стабилизации чужеродных белков в клетках исследована еще недостаточно (В. И. Танышин, 1985).

2. В большинстве случаев продукт трансплантированного гена не высвобождается в культуральную среду и накапливается внутри клетки, что существенно затрудняет его выделение. Так, принятый метод получения инсулина с помощью *E. coli* предполагает разрушение клеток и последующую очистку инсулина. В связи с этим большое значение придается трансплантации генов, отвечающих за экскрецию белков из клеток. Имеются сведения о новом способе генноинженерного синтеза инсулина, который выделяется в культуральную среду (М. Sun, 1983).

Оправдана также переориентация биотехнологов с излюбленного объекта генетической инженерии *E. coli* на другие биообъекты. *E. coli* экскретирует сравнительно мало белков. Кроме того, клеточная стенка этой бактерии содержит токсическое вещество эндотоксин, которое необходимо тщательно отделять от продуктов, используемых в фармакологических целях. Как объекты генетической инженерии перспективны поэтому грамположительные бактерии (представители родов *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*). В частности *Bac. subtilis* выделяет более 50 различных белков в культуральную среду (С. Vard, 1984). В их число входят ферменты, инсектициды, а также антибиотики. Перспективны также эукариотические организмы. Они обладают рядом преимуществ, в частности, дрожжевой интерферон синтезируется в гликолизированной форме, как и нативный человеческий белок (в отличие от интерферона, синтезируемого в клетках *E. coli*).

3. Большинство наследственных признаков кодируется несколькими генами, и генноинженерная разработка должна включать стадии последовательной трансплантации каждого из генов. Примером реализованного многогенного проекта является создание штамма *Pseudomonas sp.*, способного утилизировать сырую нефть. С помощью плазмид штамм последовательно обогащался генами ферментов, расщепляющих октан, камфору, ксилон, нафталин (В. Г. Дебабов, 1982). В некоторых случаях возможна не последовательная, а одновременная трансплантация целых

блоков генов с помощью одной плазмиды. В составе одной плазмиды может быть перенесен в клетку-реципиент *nit*-оперон *Klebsiella pneumonia*, отвечающий за фиксацию азота. Способность организма к фиксации азота определяется наличием по меньшей мере 17 различных генов, отвечающих как за структурные компоненты нитрогеназного комплекса, так и за регуляцию их синтеза.

К настоящему времени генетическая инженерия освоила все царства живого. Фенотипическое выражение «чужих» генов получено не только у бактерий, но и у дрожжей, грибов, растений, животных. Удобными, хорошо изученными и промышленно ценными объектами генетической инженерии служат дрожжи, представители родов *Saccharomyces* (винные, пекарские, пивные дрожжи), *Zygomonas* (для получения этанола), *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus* и т. д. (для получения биомассы и микробного белка). К числу успешных генноинженерных разработок можно отнести введение в дрожжи генов, кодирующих α -интерферон, поверхностный антиген вируса гепатита В человека, оперон, отвечающий за азотфиксацию *Klebsiella pneumonia*. Ведутся генноинженерные работы с грибами как продуцентами антибиотиков. Имеется проект по трансформации *Aspergillus nidulans* с целью передачи ему свойств продуцента пенициллина. Природные штаммы гриба синтезируют небольшие количества этого антибиотика (J. W. Bennet, W. Tazewell, 1984).

Генетическая инженерия растений осуществляется на организменном, тканевом и клеточном уровнях. Показанная, пусть для немногих видов (для томатов, табака, люцерны), возможность регенерации целого организма из одиночной клетки резко повысила интерес к генетической инженерии растений. Однако здесь, помимо чисто технических, предстоит решить проблемы, связанные с нарушениями структуры генома (изменения ploidy, хромосомные перестройки) культивируемых клеток растений. Примером реализованного генноинженерного проекта является синтез фазеолина, запасного белка фасоли, в регенерированных растениях табака. Трансплантация гена, отвечающего за синтез фазеолина, была проведена с использованием Ti-плазмиды в качестве вектора. С помощью Ti-плазмиды трансплантирован также ген устойчивости к антибиотику неомицину в растения табака, а с помощью CMV-вируса — ген устойчивости к ингибитору дигидрофолатредуктазы метотрексату в растения репы.

Магистральные пути развития генетической инженерии растений включают: 1) обогащение культурных растений дополнительными запасными веществами (зеин, секалин, глютен, леугмин, глиадин, альбумин) с помощью генов, взятых от других растений; 2) повышение эффективности фотосинтеза растений на основе генов рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы, хлорофилл *a/b*-связывающих белков и т. д.; 3) изменение азотного метаболизма, например с использованием генов, кодирующих глутамин-

синтазу, участвующую в транспорте и запасании азота; 4) придание устойчивости к гербицидам, засолению почв, повышенной и пониженной температурам, другим неблагоприятным факторам внешней среды. Помимо этого, растения могут использоваться для получения белков человека — инсулина, интерферона, гормона роста.

Генетическая инженерия растений включает манипуляции не только с ядерным геномом клеток, но также с геномом хлоропластов и митохондрий. Именно в хлоропластный геном наиболее целесообразно вводить ген азотфиксации для устранения потребности растений в азотных удобрениях. В митохондриях кукурузы найдены две плазмиды (S-1 и S-2), обуславливающие цитоплазматическую мужскую стерильность. Если селекционерам необходимо «запретить» самоопыление кукурузы и допустить лишь перекрестное опыление, они могут не заботиться об удалении тычинок вручную, если берут для оплодотворения растения с цитоплазматической мужской стерильностью. Такие растения могут быть выведены путем длительной селекции, однако генетическая инженерия предлагает более быстрый и целенаправленный метод — прямое введение плазмид в митохондрии клеток кукурузы (C. S. Levings, 1983). К разработкам в области генетической инженерии растений следует отнести также генетическую модификацию симбионтов растений — клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*. В клетки этих бактерий с помощью плазмид предполагается вводить *hup* (hydrogen uptake)-ген, в природе существующий лишь у некоторых штаммов *R. japonicum* и *R. leguminosarum*. *Hup*-ген обуславливает поглощение и утилизацию газообразного водорода, высвобождаемого при функционировании азотфиксирующего ферментного комплекса клубеньковых бактерий. Рециклизация водорода позволяет избежать потерь восстановительных эквивалентов при симбиотической азотфиксации в клубеньках бобовых растений и значительно повысить продуктивность этих растений (S. T. Lim et al., 1980; А. А. Баев, К. М. Злотников, 1984).

Тканевая специфичность трансплантированного гена — важная проблема генетической инженерии растений. Так, содержание фазеолина у табака, модифицированного соответствующим геном фасоли, было одинаковым во всех частях растения, причем выход продукта был низким, менее 1% от общего белка табака. В то же время у самой фасоли фазеолин накапливается только в семенах, где его содержание составляет до 50% от общего количества белка (W. J. Netzel, 1983). В последние годы удалось выделить и ввести в состав векторов регуляторные последовательности, обеспечивающие высокоэффективное выражение генов в определенных органах и тканях растения и (или) на определенных фазах его онтогенеза. Таким путем 1) ген фазеолина, введенный в растение табака, поставили под контроль промотора, функционирующего только в прорастающих семенах; 2) ген малой субъединицы рибулезо-бисфосфаткарбок-

силазы гороха, перенесенный в табак и петунию, ввели в состав оперона, активируемого светом и «работающего» лишь в тканях листа (J. A. Briant, 1986).

Генноинженерные манипуляции с растениями породили опасения, аналогичные тем, которые высказывались в отношении генетической инженерии бактерий в 70-е годы. В то время тревогу общественности вызывала возможность превращения кишечной палочки и других бактерий в «генетических монстров», которые выйдут из-под контроля исследователей и станут возбудителями страшных заболеваний. Были приняты меры по предохранению лабораторных генноинженерных мутантов *E. coli* и других бактерий от распространения в окружающей среде. В начале 80-х годов эти меры были значительно ослаблены, так как исследовательская практика показала беспочвенность многих мрачных прогнозов.

В наше время опасение вызывает возможность выхода генетических векторов и растений, несущих эти векторы, из-под надзора биотехнологов. Во-первых, говорят об угрозе превращения генноинженерных культурных растений в сорные травы. Комплекс «сорняковости», т. е. признаков, необходимых для быстрого распространения в природе в ущерб другим растениям, — эффективные механизмы рассеивания семян, адаптация к неблагоприятным факторам внешней среды и т. д. — едва ли может сформироваться в результате трансплантации одного или немногих генов. Однако устойчивость к гербицидам, обусловленная трансплантацией одного гена, может вызвать серьезные проблемы в севооборотах: культивируемое на определенной посевной площади устойчивое к гербицидам растение будет на следующий год выступать по отношению к сменяющей его сельскохозяйственной культуре как сорняк, против которого бессильны гербициды (H. Hauptli, 1985).

Вторая угроза — биохимические изменения, вызванные генетическими модификациями, могут привести к утрате растениями пищевой или кормовой ценности и даже к приобретению ими токсичности. Эта проблема присуща не только генетической инженерии, но и традиционным методам селекции. Так, некоторые сорта сорго, полученные обычными селекционными методами, содержат танины, снижающие эффективность утилизации белка сорго сельскохозяйственными животными. Борьба с этой опасностью предусматривает проведение тщательного тестирования всех генноинженерных растений перед их высевом в поле.

В области генетической инженерии животных клонированы гены β-глобина мышей, фага λ, тирозиновой тРНК *E. coli*, тимидинкиназы, гуанинфосфорибозилтрансферазы. Помимо почечных клеток зеленой африканской мартышки, излюбленного объекта для манипуляций, в последние годы испытываются все новые культуры клеток, в том числе клетки человека и насекомых, в частности непарного шелкопряда, где с применением вирусного вектора удалось добиться экспрессии гена β-интерферона чело-

века. Этот ген успешно клонирован также в клетках млекопитающих. Клетки млекопитающих растут медленно, на дорогих средах, легко повреждаются различными внешними воздействиями. Однако они необходимы для получения генноинженерных белковых продуктов, идентичных синтезируемым в человеческом организме. Перенос генов в клетки высших животных с помощью вирусов не должен приводить к повреждению клеток, тем более к их лизису, как это наблюдается при обычной вирусной инфекции. При условии снижения вредоносного действия векторов-вирусов до безопасного уровня возможны генетические манипуляции с клетками не только *in vitro*, в культуре, но и *in vivo*, в составе целого организма. Вирусы легко распространяются по всему организму, поставляя каждой его клетке желаемый ген. В приложении к человеку это могло бы означать лечение наследственных заболеваний, связанных с нехваткой необходимых генов путем заражения больного вирусом, несущим подходящий ген. В генетической инженерии животных и человека, как и в генетической инженерии растений, еще не достигнуто тканеспецифического выражения генов, и решение этой проблемы ищут на путях введения в векторы определенных промоторно-регуляторных участков. Потенциально можно было бы лечить сахарный диабет более радикально, чем сейчас, когда генетическая инженерия поставляет лишь инсулин, синтезируемый *E. coli*. Можно мечтать о введении в человеческий организм вектора с геном инсулина, который будет направлять синтез инсулина только в клетках островков Лангерганса поджелудочной железы — естественных продуцентов этого гормона.

Отдаленной задачей пока остается применение методов генетической инженерии для улучшения пород сельскохозяйственных животных. Речь идет об увеличении эффективности использования кормов, повышении плодовитости, выхода молока и яиц, устойчивости животных к заболеваниям, ускорении их роста, улучшении качества мяса. Однако до сих пор не выяснена генетика всех этих признаков сельскохозяйственных животных, что препятствует попыткам генетических манипуляций в этой области.

Улучшение продуцентов, используемых в производстве, методами генетической инженерии. Генетическая инженерия дает в руки биотехнологов не только новые продуценты ценных соединений, но позволяет также повышать эффективность организмов, используемых в производстве. Здесь генетическая инженерия идет рука об руку с традиционными методами селекции.

Распространенным способом повышения выхода полезного продукта является **амплификация** — увеличение числа копий генов. Один из первых успешных результатов в этой области описан в 1974 г. Триптофановый оперон *E. coli* клонировали в составе плазмиды. Синтез ферментов триптофанового оперона в клетках *E. coli*, содержащих гибридную плазмиду, резко возрастал, количество этих ферментов составляло более 25% от обще-

го белка клетки. Амплификацией генов в составе векторов получены высокоэффективные продуценты треонина и пролина.

Такие биотехнологически ценные продукты, как антибиотики, аминокислоты, витамины, характеризуются в большинстве случаев длинными и сложными путями биосинтеза, который управляется десятками различных генов. Выделение этих генов и их клонирование с целью амплификации часто представляет собой трудновыполнимую задачу. В ряде случаев, однако, синтез антибиотиков, например пептидной природы, идет в мультиферментных комплексах, кодируемых одним опероном, который может быть сравнительно легко встроен в подходящий вектор и клонирован. Если же гены не скомпонованы в единый оперон и разбросаны по геному, повышение выхода продукта достигается клонированием генов, соответствующих узким местам биосинтеза. Амплификация этих генов стимулирует протекание реакций, лимитирующих скорость всего процесса.

У ряда бактерий узкое место соответствует не синтезу продукта, а его экскреции из клетки. Повышение эффективности транспорта продукта из клетки в культуральную жидкость создает «тягу» для ускорения синтеза новых порций продукта, например аминокислот.

Известно, что одни и те же системы транспорта у бактерий часто отвечают за экскрецию нескольких типов соединений. Например, у *E. coli* выделение аминокислот и выброс поглощенного клеткой тетрациклина (способ защиты клетки от действия этого антибиотика) обеспечиваются единой транспортной системой. Применительно к *E. coli* получены плазмидные векторы, несущие гены повышенной устойчивости к тетрациклинам за счет их более эффективного удаления из клеток. Ожидается, что трансформация *E. coli* этими плазмидами с последующим скринингом штаммов, наиболее устойчивых к тетрациклину, приведет к получению высокоэффективных продуцентов аминокислот (В. А. Плакунов, 1986).

У представителей рода *Streptomyces* синтез окситетрациклина находится под контролем нескольких десятков генов. Процесс в целом и его регуляция изучены еще недостаточно. Дикie штаммы стрептомицетов устойчивы к канамицину. Существуют мутанты, чувствительные к этому антибиотику. Оказалось, что ревертанты, полученные введением генов устойчивости к канамицину, одновременно повышают уровень синтеза окситетрациклина (В. Н. Даниленко и др., 1985).

Повышение эффективности традиционных методов достигается также с помощью локализованного (сайт-специфического) мутагенеза *in vitro*: например, химическими мутагенами обрабатывают не весь геном в составе клеток, а его фрагмент с интересующим нас геном, полученный с помощью рестриктазы. Более тонкое вмешательство в структуру гена осуществляется путем его химико-ферментативной модификации, вплоть до замены отдельных триплетов.

Раньше, до появления методов генетической инженерии, селекционер шел от продукта к гену: имея в распоряжении мутанты по тому или иному белку, он стремился выяснить расположение соответствующих мутаций в геноме, составить генетическую карту. Ныне биотехнолог, вооруженный методами генетической инженерии, движется от гена к продукту: внося заранее определенные изменения в нуклеотидную последовательность ДНК, он контролирует изменения в соответствующем белке. Таким путем может быть достигнута оптимизация структуры ферментов, гормонов, вакцин-антигенов.

Манипуляции со структурой белков в результате модификации кодирующих их генов составляют суть белковой инженерии. Одна из ее задач — усовершенствование уже полученных генно-инженерных продуцентов биологически активных белков.

К важным направлениям генноинженерных разработок следует отнести также смену питательных потребностей продуцента в целях расширения сырьевой базы промышленности и увеличение эффективности конверсии субстрата. Так, после введения соответствующих генов клетки *E. coli* — продуценты треонина — стали утилизировать сахарозу. Трансплантация гена глутаматдегидрогеназы от *E. coli* в клетки метилотрофа *Methylophilus methylotrophus* позволила повысить эффективность использования углеродных субстратов этой бактерией, используемой для получения кормового белка (В. Г. Дебабов, 1982, 1984; М. J. Haas, 1984). Первичное окисление метанола у дрожжей катализируется оксидазой, а у бактерий — дегидрогеназой, причем более эффективно. Заманчиво перенесение гена метанолдегидрогеназы из бактерий в клетки дрожжей, что позволило бы соединить технологические преимущества дрожжей как источников кормового белка с физиологически эффективной конверсией метанола у бактерий (Г. К. Скрыбин, В. К. Ерошин, 1984). На повестке дня стоит вопрос о трансплантации в клетки промышленных микроорганизмов генов новых систем рестрикции — модификации, что позволило бы избежать потерь, связанных с лизисом клеток фагами (В. Г. Дебабов, 1982).

Таким образом, генетическая инженерия открывает перед биотехнологами большие перспективы, связанные как с созданием принципиально новых продуцентов ценных для человека соединений, так и с увеличением эффективности продуцентов, уже используемых в производстве.

§ 4. Клеточная инженерия

Основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток — слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Слияние клеток может быть полным или же клетка-реципиент может приобрести отдельные части клетки-донора: цитоплазму, митохондрии, хлоропласты, ядерный геном или его крупные блоки. Введение небольших блоков генетической

информации обычно осуществляется средствами генетической инженерии. Соматическая гибридизация имеет более широкие возможности для скрещивания филогенетически отдаленных организмов, чем половое скрещивание, при котором Природа допускает лишь строго определенные сочетания родительских форм.

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

По отношению к животным клеткам применяют также вирус Сендай, действие которого как сливающего агента, по-видимому, связано с частичным гидролизом белков цитоплазматической мембраны. Участок субъединицы F_1 вируса обладает протеолитической активностью (С. Nicolau et al., 1984). Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки, при этом получают протопласты. Клеточную стенку подвергают ферментативному гидролизу, применяя лизоцим (для бактериальных клеток), зимолиазу улитки (для клеток грибов), комплекс циллюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ, продуцируемый грибами (для клеток растений). Набухание и последующее разрушение протопластов предотвращается созданием повышенной осмолярности среды. Подбор гидролитических ферментов и концентрации солей в среде с целью обеспечения максимального выхода протопластов представляет собой сложную задачу, решаемую в каждом случае отдельно.

Для скрининга полученных гибридных клеток используют различные подходы: 1) учет фенотипических признаков; 2) создание селективных условий, в которых выживают лишь гибриды, объединившие геномы родительских клеток.

Возможности метода слияния клеток. Метод слияния соматических клеток открывает перед биотехнологией значительные перспективы (Ю. Ю. Глеба, К. М. Сытник, 1982, 1984).

1. Возможность скрещивания филогенетически отдаленных форм живого. Путем слияния клеток растений получены плодовые, фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом (эквивалентные природному рапсу), петунии. Имеются стерильные межродовые гибриды картофеля и томата, стерильные межтрибные гибриды арабидопсиса и турнепса, табака и картофеля, табака и беладонны, которые образуют морфологически ненормальные стебли и растения. Получены клеточные гибриды между представителями различных семейств, существующие, однако, лишь как неорганизованно растущие клетки (табака и гороха, табака и сои, табака и конских

бобов). Получены межвидовые (*Saccharomyces uvarum* и *S. diastolicus*) и межродовые (*Kluyveromyces lactis* и *S. cerevisiae*) гибриды дрожжей (J.F.T. Spencer, D. M. Spencer, 1984; C. J. Panchal et al., 1984). Имеются данные о слиянии клеток различных видов грибов и бактерий.

Несколько курьезными представляются опыты по слиянию клеток организмов, относящихся к различным царствам, например клеток лягушек *Xenopus laevis* и протопластов моркови. Гибридная растительно-животная клетка постепенно одевается клеточной стенкой и растет на средах, на которых культивируют растительные клетки. Ядро животной клетки, по-видимому, достаточно быстро теряет свою активность (E. C. Cocking, 1984).

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

Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодовитее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток. В целях асимметричной гибридизации возможна избирательная обработка клеток одного из родителей для разрушения части его хромосом. Возможен прицельный перенос из клетки в клетку нужной хромосомы. Представляет также интерес получение клеток, у которых гибридной является только цитоплазма. Цитоплазматические гибриды образуются, когда после слияния клеток ядра сохраняют свою автономию и при последующем делении гибридной клетки оказываются в разных дочерних клетках. Скрининг таких клеток проводится по генам-маркерам ядерного и цитоплазматических (митохондриального и хлоропластного) геномов.

Клетки со слившейся цитоплазмой (но не ядрами) содержат ядерный геном одного из родителей и в то же время совмещают цитоплазматические гены слившихся клеток. Есть указания на рекомбинацию ДНК митохондрий и хлоропластов в гибридных клетках (Ю. Ю. Глеба, К. М. Сытник, 1984).

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

4. Гибридизация клеток, несущих различные программы развития, — слияние клеток различных тканей или органов, слияние нормальных клеток с клетками, программа развития которых изменена в результате злокачественного перерождения. В этом случае получают так называемые *гибридомные клетки*, или *гибридомы*, наследующие от нормальной родительской клетки способность к синтезу того или иного полезного соединения, а от злокачественной — способность к быстрому и неограниченному росту.

Гибридомная технология. Получение гибридом на сегодняшний день — наиболее перспективное направление клеточной инженерии (Б. Б. Фукс и др., 1983; О. В. Рохлин, 1984; A. Röttsch, B. W. Glickman, 1980; J. F. Kearney, 1984). Основная цель — «обессмертить» клетку, продуцирующую ценные вещества путем слияния с раковой клеткой и клонирования полученной гибридомной клеточной линии. Гибридомы получены на основе клеток — представителей различных царств живого. Слияние клеток растений, растущих в культуре обычно медленно, с клетками растительных опухолей позволяет получить клоны быстрорастущих клеток — продуцентов нужных соединений. Многообразны применения гибридомной технологии к животным клеткам, где с ее помощью планируется получение неограниченно размножающихся продуцентов гормонов и белковых факторов крови. Наибольшее практическое значение имеют гибридомы — продукты слияния клеток злокачественных опухолей иммунной системы (миелом) с нормальными клетками той же системы — лимфоцитами.

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

Слияние Т-лимфоцита-киллера с опухолевой клеткой дает клон неограниченно размножающихся клеток, отслеживающих определенный антиген — тот, к которому был специфичен взятый Т-лимфоцит. Подобные Т-киллерные гибридомные клоны пытаются использовать для борьбы с раковыми клетками непосредственно в организме больного (Б. Фукс и др., 1981; 1983).

При слиянии В-лимфоцита с миеломной клеткой получают В-гибридомные клоны, широко применяемые как продуценты антител, нацеленных на тот же антиген, что и антитела, синтезируемые породившим клон В-лимфоцитом, т. е. *моноклональных антител*. Моноклональные антитела однородны по своим свойствам, они обладают одинаковым сродством к антигену и связываются с одной единственной антигенной детерминантой. В этом состоит важное преимущество моноклональных антител — продуктов В-гибридом, по сравнению с антителами, получаемыми без применения клеточной инженерии, путем иммунизации лабораторного животного избранным антигеном с последующим вы-

делением антител из сыворотки его крови или в результате непосредственного взаимодействия антигена с популяцией лимфоцитов в культуре ткани. Подобные традиционные методы дают смесь антител, различных по специфичности и средству к антигену, что объясняется участием в выработке антител многих различных клонов В-лимфоцитов и наличием у антигена нескольких детерминант, каждая из которых соответствует особому типу антител. Таким образом, моноклональные антитела избирательно связываются лишь с одним антигеном, инактивируя его, что имеет большое практическое значение для распознавания и лечения заболеваний, вызываемых чужеродными агентами — бактериями, грибами, вирусами, токсинами, аллергенами и трансформированными собственными клетками (раковые опухоли). Моноклональные антитела успешно применяют в аналитических целях для изучения клеточных органелл, их структуры или отдельных биомолекул.

До недавнего времени для гибридизации использовали исключительно миеломные клетки и В-лимфоциты мыши и крысы. Производимые ими моноклональные антитела имеют ограниченное терапевтическое применение, так как они сами представляют чужеродный белок для человеческого организма. Освоение технологии получения гибридом на основе иммунных клеток человека связано со значительными трудностями: человеческие гибридомы растут медленно, сравнительно мало стабильны. Однако уже получены гибридомы человека — продуценты моноклональных антител. Оказалось, что и человеческие моноклональные антитела в некоторых случаях вызывают иммунные реакции, и их клиническая эффективность зависит от правильного подбора класса антител, гибридомных линий, подходящих для данного больного. К достоинствам человеческих моноклональных антител относится способность распознавать тонкие различия в структуре антигена, которые не распознаются моноклональными антителами мыши или крысы. Предприняты попытки получения химерных гибридом, сочетающих мышинные миеломные клетки и человеческие В-лимфоциты; такие гибридомы находят пока лишь ограниченное применение (К. Нагон, 1984).

Наряду с несомненными преимуществами моноклональные антитела имеют и недостатки, порождающие проблемы при их практическом использовании. Они не стабильны при хранении в высушенном состоянии, в то же время в смеси обычных (поликлональных) антител всегда присутствует группа антител, устойчивая при избранных условиях хранения. Таким образом, неоднородность обычных антител дает им дополнительный резерв стабильности при изменении внешних условий, что соответствует одному из основных принципов повышения надежности систем. Моноклональные антитела нередко имеют слишком низкое сродство к антигену и чрезмерно узкую специфичность, что препятствует их применению против изменчивых антигенов, характерных для инфекционных агентов и опухолевых клеток. Необходи-

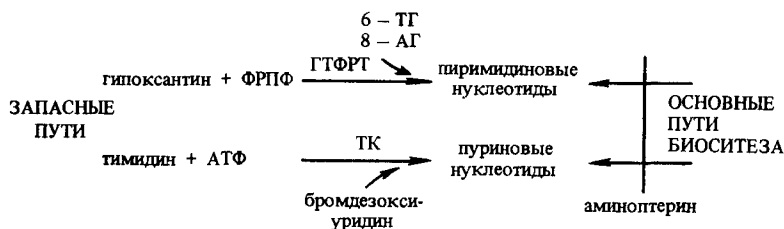


Рис. 6. Схема получения мутантных опухолевых клеток, дефектных по ферментам запасных путей биосинтеза нуклеотидов, и последующей селекции гибридных клеток (по Б. Б. Фукс и др., 1983; J. F. Kearney, 1984)

мо отметить также очень высокую стоимость моноклональных антител на международном рынке.

Общая схема получения гибридом на основе миеломных клеток и иммунных лимфоцитов включает следующие этапы.

1. Получение мутантных опухолевых клеток, погибающих при последующей селекции гибридомных клеток. Стандартным подходом является выведение линий миеломных клеток, не способных к синтезу ферментов запасных путей биосинтеза пуринов и пиримидинов из гипоксантина и тимидина соответственно (рис.* 6). Отбор таких мутантов опухолевых клеток проводят с применением токсических аналогов гипоксантина и тимидина. В среде, содержащей эти аналоги, выживают только мутантные клетки, которые лишены ферментов гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы и тимидинкиназы, необходимых для запасных путей биосинтеза нуклеотидов.

* Существует основной и запасной пути биосинтеза нуклеотидов. На запасном пути предшественником для пуриновых нуклеотидов служит гипоксантин, для пиримидиновых — тимидин. Превращение этих предшественников в нуклеотиды в реакции с фосфорибозилпирофосфатом (ФРПФ) катализируется гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазой (ГГФРТ) и тимидинкиназой (ТК). Аналоги гипоксантина и тимидина 6-тиогуанин (6-ТГ) или 8-азагуанин (8-АГ) и бромдезоксидеоксиуридин под действием ГГФРТ и ТК превращаются в соединения, сходные по структуре с нуклеотидами пуриновой и пиримидиновой природы, но не выполняющие их функции в клетке и, более того, блокирующие биосинтез нуклеотидов. Это приводит к гибели клеток, поэтому на среде с 6-ТГ (8-АГ) и бромдезоксидеоксиуридином выживают только мутантные клетки, утратившие ферменты запасного пути биосинтеза нуклеотидов. После слияния полученных миеломных клеток, дефектных по ГГФРТ и ТК, с нормальными В-лимфоцитами клеточную популяцию, содержащую слившиеся и не слившиеся клетки, переносят на среду НАТ, в состав которой входят гипоксантин, тимидин и ингибитор основного пути биосинтеза нуклеотидов аминоптерин. Миеломные клетки, не способные к использованию гипоксантина и тимидина для синтеза нуклеотидов, погибают. В-лимфоциты имеют ферменты, необходимые для запасного пути биосинтеза, но они нежизнеспособны вне организма. Таким образом, среда НАТ позволяет отобрать только гибридомные клетки, совмещающие способность к неограниченному росту и размножению *in vitro* с наличием ферментов, необходимых для утилизации добавленных нуклеотидных предшественников.

2. Получение лимфоцитов — продуцентов антител к заданным антигенам. Животное (мышь, реже крысу, кролика) иммунизируют введением антигена в брюшную полость, внутривенно или подкожно. Для получения человеческих гибридом прибегают к иммунизации лимфоцитов человека в культуре ткани, что является более сложной и многоэтапной процедурой.

3. Слияние лимфоцитов с опухолевыми клетками: сливающим агентом служит полиэтиленгликоль, реже лизолецитин или вирус Сендай, а также мощное электрическое поле. Для успешного слияния клеток мышей и человека последние предварительно обрабатывают проназой, нейраминидазой или диспазой (J. van Brunt, 1985).

4. Скрининг гибридомных клеток. Применяют селективную среду НАТ, содержащую аминоптерин, блокирующий синтез нуклеотидов по основным путям, и предшественники запасных путей биосинтеза — гипоксантин и тимидин (рис. 6). На этой среде родительские миеломные клетки погибают как генетически дефектные по ферментам запасных путей биосинтеза нуклеотидов. Родители-лимфоциты, не слившиеся с миеломными клетками, тоже погибают, поскольку они не способны расти вне организма в заданных условиях. Гибридомные клетки сочетают в себе способность к неограниченному росту и к синтезу нуклеотидов по запасным путям и поэтому накапливаются в культуре.

5. Проверка способности гибридомных клеток продуцировать моноклональные антитела к заданному антигену. Для этого используют метод иммуносорбентов. Образец культуральной жидкости с гибридомными клетками вводят в реакцию с соответствующим антигеном, прочно закрепленным на носителе. Для распознавания комплекса антиген — антитело к используемым антителам получают вторые антитела путем иммунизации этими иммуноглобулинами животного (например, иммуноглобулины мыши вводят в организм козы). Эти вторые антитела ковалентно связывают с каким-либо ферментом (например, с щелочной фосфатазой или пероксидазой). Если вырабатываемые гибридомой антитела действительно связывают заданный антиген, то добавление к ним вторых антител с пришитым ферментом ведет к образованию комплекса антиген — моноклональное антитело — антитело к моноклональному антителу — фермент. Последующее добавление субстрата, соответствующего ферменту, запускает ферментативную реакцию, протекание которой регистрируется по образованию ярко окрашенного продукта.

Существуют радиоиммунный и иммунофлуоресцентный варианты метода. Здесь антитела к иммуноглобулинам несут не фермент, а радиоактивную или флуоресцирующую метку.

6. Клонирование гибридомных клеток, прошедших проверку на образование моноклональных антител, с постоянным контролем на стабильность их иммунных свойств.

7. Массовое культивирование гибридомы, выделение, концентрирование и очистка продуцируемых антител. Помимо выра-

щивания гибридных клеток в культуре, для получения больших количеств моноклональных антител используют внутрибрюшинное заражение мышей гибридными клетками.

Ряд других приложений метода слияния клеток относится к растениям и микроорганизмам, для которых освоена технология выращивания новых полноценных особей из слившихся протопластов.

Выведение новых и улучшение существующих сортов растений и штаммов микроорганизмов. Важное и перспективное направление клеточной инженерии — это выведение новых и улучшение существующих сортов растений и штаммов микроорганизмов. Получаемые путем слияния протопластов внутривидовые или межвидовые гибриды, которые во многих случаях не могут быть выведены в результате обычного скрещивания, доставляют новый ценный материал для селекционеров. Межвидовые гибриды картофеля и табака отправлены в СССР на опытные поля селекционных станций (Ю. Ю. Глеба, К. М. Сытник, 1984).

Однако для выведения нового сорта растения на основе слияния протопластов необходимо преодолеть два основных барьера: а) превращение протопластов в клетки, покрытые клеточной стенкой, и б) получение из клетки целого растения. Плохо образуют клеточную стенку протопласты овса и розы (Р. Г. Бутенко, 1981), протопласты зерновых могут регенерировать клеточную стенку и остаются жизнеспособными в течение нескольких недель, но не способны к регулярному делению и тем более к формированию целого растения (Э. Кокинг, 1980).

Кроме этих двух барьеров возникают дополнительные проблемы. Даже если оба родительских протопласта относятся к видам растений, для которых показана возможность регенерации целых особей, слившиеся клетки нередко утрачивают способность к такой регенерации в силу «перетасовки» их генетического материала. Эта трудность до сих пор не устранена, она связана с асинхронным делением ядер двух родителей в слившихся протопластах.

Улучшение существующих сортов растений и штаммов микроорганизмов путем введения в их клетки ядерных или цитоплазматических генов как аспект применения клеточной инженерии в значительной мере дублирует генетическую инженерию. Например, признак цитоплазматической мужской стерильности может быть передан от растения к растению не только с помощью генетической инженерии, но и путем слияния двух клеток, одна из которых несет соответствующие плазмиды в митохондриях. Проведены успешные опыты по передаче цитоплазматических (хлоропластных) генов устойчивости к гербициду атразину от сурепицы к культурным растениям семейства крестоцветных методом слияния клеток (J. A. Briant, 1986).

Аналогичные перспективы открываются перед методом слияния клеток в приложении к грибам и бактериям.

Клеточные ассоциации. Клеточная инженерия не исчерпывается слиянием клеток как единственным методом. Технология культивирования клеток *in vitro* позволяет осуществлять с ними разнообразные манипуляции. В течение многих лет исследуется возможность введения в растительные протопласты и животные клетки органелл, отдельных хромосом и целых клеток цианобактерий или зеленых водорослей. В отличие от технологии слияния клеток эти разработки пока находятся на поисковой стадии. В частности, практически все попытки заселения микроскопическими водорослями цитоплазмы растительных клеток завершились неудачей.

Более успешно проводятся исследования по созданию ассоциаций клеток различных организмов. Речь идет о получении смешанных культур клеток двух или более организмов с целью создания искусственных симбиозов, т. е. выгодного для партнеров сожительства. Известными примерами естественных симбиозов служат лишайники, объединяющие в своем составе клетки гриба и водоросли (или цианобактерии), система «инфузория — цианобактерии» (последние живут в цитоплазме инфузории и обеспечивают ее кислородом), ассоциация папоротника *Azolla* и цианобактерии *Anabaena azollae*, обеспечивающей папоротник азотом, фиксируемым из воздуха.

Проведены успешные опыты по введению азотфиксирующей *Anabaena variabilis* в растения табака. Эти опыты имеют очень большое значение. В связи с огромными затратами на производство азотных удобрений в последние годы обсуждается вопрос о создании культурных растений, связывающих атмосферный азот. Один из предлагаемых путей — создание симбиозов растений и азотфиксирующих цианобактерий.

Попытка ввести цианобактерию *A. variabilis* непосредственно в черенки зрелых растений табака не увенчалась успехом. Однако при совместном культивировании клеток мезофильной ткани листа табака и цианобактерий удается получить растения-регенеранты, содержащие цианобактерии. По данным электронной микроскопии, цианобактерии располагаются на поверхности листа и стебля, проникают в глубь устьиц листа и сосудистой системы стебля (Т. Г. Корженевская, Р. Г. Бутенко, М. В. Гусев, 1985). В составе такой ассоциации цианобактерии фиксируют азот из атмосферы. Получены также ассоциации клеток женьшеня и паслена дольчатого с цианобактерией *Chloroglea fritschii*. Под влиянием цианобактерий в клетках паслена активируется синтез гликоалкалоидов.

Таким образом, клеточная инженерия представляет собой эффективный способ модификации биологических объектов, позволяющих создавать новые ценные продукты как на организменном, так и на тканевом и клеточном уровнях. Современная клеточная инженерия позволила обратить на пользу человеку способность раковых клеток к неограниченному росту, превратив их в гибридомы — живые фабрики важнейших продуктов, в пер-

вую очередь моноклональных антител. В сопоставлении с генетической инженерией можно указать на более крупномасштабный характер транспорта информации между живыми организмами с применением клеточной инженерии. С применением клеточной инженерии в клетку вводят целые геномы (ядерный, хлоропластный, митохондриальный), в то время как генетическая инженерия в основном нацелена на передачу индивидуальных генов. В то же время клеточная инженерия уступает генетической инженерии по уровню «интеллектуальной проработки» экспериментов: генно-инженерные разработки позволяют прицельно передать от донора к реципиенту строго определенный ген, в то время как применение клеточной инженерии связано со значительной неопределенностью в судьбе хромосом, ядер в целом, цитоплазмы и ее оргanelл как в процессе слияния клеток, так и при последующем культивировании клеток-гибридов. Центр тяжести разработок в области клеточной инженерии приходится поэтому на скрининг клеточных популяций для выявления клеток с желаемыми свойствами (Ю. Ю. Глеба, 1985).

§ 5. Популяционная устойчивость биологических объектов

Поддержание биообъекта в рабочем состоянии, сохранение его ценных свойств является важной биотехнологической проблемой. Утрата этих свойств биообъектом перечеркивает результаты усилий по его селекции и модификации. В последние годы широким фронтом ведутся исследования по выяснению причин этого грозного для биотехнологии явления и устранению его.

Биореактор населен, как правило, огромной популяцией культивируемых микроорганизмов или клеток растений, животных. Численность этой популяции составляет 10^{15} и более клеток, что в миллионы раз превышает население земного шара. В этих условиях существенную роль играют процессы, основанные на маловероятных генетических событиях. Так, спонтанные мутации, происходящие с низкой частотой (1 мутация на 10^6 — 10^8 клеток), могут привести к быстрому накоплению в биореакторе мутантных форм, особенно в том случае, если такие формы характеризуются большей скоростью роста и повышенной жизнеспособностью по сравнению с исходными формами. Процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм более приспособленными в клеточной популяции носит название *автоселекции*, т. е. это процесс, протекающий без участия селекционера и часто вопреки его планам.

У бактерий показательным примером служит фазовая диссоциация, представляющая собой частый (1 событие на 10^2 — 10^3 клеток) взаимопереход трех форм (R, S и M). Эти формы различаются по структуре клеточной стенки и капсулы, а также по многим физиолого-биохимическим свойствам и в том числе по способности к синтезу биологически активных веществ. В част-

ности, в популяции грамположительной бактерии *Rhodococcus rubropertinctus* М- и S-варианты, более активные как продуценты полезных веществ, постепенно вытесняются R-вариантом (Р. А. Степанова, 1985).

Многолетний опыт микробиологов свидетельствует о том, что бактерии-мутанты, продуцирующие большие количества того или иного вещества (сверхпродуценты), обычно проигрывают в борьбе за существование диким штаммам, более экономно расходующим вещество и энергию в процессах жизнедеятельности. Ауксотрофы легко вытесняются ревертантами-прототрофами, способными к нормальному биосинтезу (Н. С. Печуркин, 1978). «С изменчивостью физиолого-биохимических свойств микроорганизмов приходится постоянно сталкиваться во всех областях микробиологии», — отмечал В. Н. Шапошников (1960).

Аналогичные проблемы возникают при культивировании клеток животных и растений вне организма. Изменения признаков клеток в процессе их культивирования, по-видимому, обусловлены резкой сменой условий их жизни при переносе из многоклеточного организма в сосуд с питательной средой. В популяции растительных клеток отмечаются нарушения митоза, что ведет к перестройкам хромосом и изменению их числа. Наблюдаются так называемые эндомитозы, сводящиеся к удвоению хромосом без деления клеток и их ядер, что влечет за собой полиплоидизацию клеток культуры (Р. Г. Бутенко, 1981; 1984; Л. В. Фролова, 1981; 1984). Серьезные изменения генома отмечаются в культурах животных клеток (Б. Б. Фукс и др., 1983).

В популяциях клеток активно идет автоселекция. Нередко преимуществом при культивировании вне организма пользуются клетки с меньшим числом хромосом, что характерно для клеток моркови. Вероятно, такие малохромосомные клетки легче и быстрее осуществляют митоз и весь клеточный цикл. В то же время известны клеточные популяции, где доминируют клетки с максимальным числом хромосом (полиплоидные), которые более защищены генетически от случайных мутаций и, что важно для биотехнологии, характеризуются повышенным уровнем синтеза биологически активных веществ (В. Я. Бродский, И. В. Урываева, 1981). Борьба за существование между различными по хромосомным наборам клетками может завершиться так называемым гомеостатическим состоянием, при котором устанавливается сбалансированное соотношение разных хромосомных наборов при некотором преобладании одного из них (З. Б. Шамина, 1978; Ву Дык Куанг, 1985).

Спонтанные процессы мутирования и автоселекции, протекающие в больших клеточных популяциях, могут иметь положительное значение: 1) в производственных процессах, целью которых является получение биомассы; автоселекция ведет к доминированию наиболее жизнеспособных и, как правило, наиболее продуктивных форм; 2) если исследователь сознательно стремится к получению форм, отличающихся от исходного штамма, для

последующей селекционной работы. Эти процессы приобретают отрицательное значение, если они связаны с утратой или ослаблением биотехнологически ценных свойств. Обычно получаемые методами генетической и клеточной инженерии штаммы относятся к числу наиболее неустойчивых.

Проблема сохранения ценных штаммов-продуцентов приобретает первоочередное значение в двух ситуациях: при их длительном хранении и при переносе этих штаммов из лабораторных культиваторов в промышленные биореакторы (масштабный переход или масштабирование).

Традиционные методы поддержания культур микроорганизмов сводятся к их выращиванию на богатых питательных средах с частыми пересевами. При этом создаются благоприятные условия для мутирования и автоселекции, что часто ведет к потере штаммов-продуцентов. Эти методы остаются единственно возможными, если не разработаны более совершенные способы хранения. Накопление в популяции нежелательных мутантов может быть предотвращено, если за каждым пересевом следует скрининг с проверкой функциональной активности клеточных клонов, сохраняющих исходные свойства. К такому пути сохранения ценных свойств клеток прибегают при клонировании гибридом.

Длительное хранение клеток без утраты ценных свойств возможно, если резко затормозить все протекающие в них жизненные процессы, в том числе и генетические перестройки. При этом культура переводится в состояние, близкое к обратимой остановке жизни — анабиозу, и существующие методы хранения различаются по степени приближения к этому состоянию.

1. Лиофильное высушивание клеток (обезвоживание под вакуумом после замораживания при температуре $-40 \div -60^{\circ}\text{C}$ и ниже). Этот метод хорошо зарекомендовал себя, например, в отношении продуцентов антибиотиков, сохраняющих активность в течение многих лет. Однако лиофилизацию переносят далеко не все биообъекты. Находясь в лиофилизированном состоянии, менее жизнестойкие клетки отмирают, популяция обогащается более жизнеспособными.

В этой связи для поддержания активности того или иного штамма-продуцента необходимо создавать селективные условия, в которых он оказывается более жизнеспособным, чем возникающие при хранении мутанты.

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

ко, не переносит L-высушивания и погибает (Т. М. Сидякина, 1985).

3. Сохранение спор (метод пригоден для спорообразующих бактерий). Споры представителей рода *Bacillus* в течение многих лет хранились без утраты их активности как продуцентов антибиотиков (С. Н. Выборных и др., 1985).

4. Криоконсервация — глубокое замораживание клеток с их последующим хранением в жидком азоте (-196°C) или его парах (-150°C). Таким путем можно сохранять в течение неопределенно долгого времени объекты, не выдерживающие другие методы хранения, — цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии, мицелиальные грибы, актиномицеты, простейшие, водоросли, культуры растительных и животных клеток, гибридомы, генноинженерные мутанты (Т. М. Сидякина, 1985). Создаются коллекции ценных организмов в глубоко замороженном состоянии — криобанки. Криоконсервация практически полностью (если исключить влияние космической ионизирующей радиации) предотвращает «порчу» генного фонда популяций клеток, реализуя наиболее полно состояние анабиоза.

Серьезные методические проблемы связаны с предохранением клеток от необратимых повреждений в процессе замораживания и последующего оттаивания. Замерзая с образованием кристаллов внутри клеток, вода разрушает клеточные мембраны. Рост кристаллов льда вне клеток при медленном замораживании ведет к резкому обезвоживанию клеток и их гибели от осмотического стресса. Оба вредных эффекта, связанных с замерзанием воды, могут быть существенно ослаблены добавлением защитных агентов — криопротекторов. Криопротекторными свойствами обладают глицерин, сахароза, пролин и другие аминокислоты, диметилсульфоксид, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид.

Глубокому охлаждению предшествует подготовка, зависящая от специфики избранного объекта. Так, для клеток моркови подготовкой служат частые пересевы, а для клеток женьшеня — закаливание низкими положительными температурами в присутствии сахарозы в постепенно увеличивающихся концентрациях (А. С. Попов, 1981; 1984). Не меньшее значение имеет отработка оптимальных режимов снижения температуры при замораживании и ее повышения при оттаивании. Обычно замораживание проводят при очень медленном снижении температуры (не более $0,5$ град/мин). Когда температура достигает определенного уровня, ее снижение приостанавливают на некоторое время (плато кристаллизаций) для того, чтобы кристаллизация воды произошла при минимальном повреждении клеток. В среду добавляют затравку для роста кристаллов.

5. Комбинированные методы хранения. В некоторых случаях наибольшая сохранность ценных свойств достигается с применением комбинации нескольких методов хранения. Так, частичное высушивание клеток способствует сохранению их жизнеспособности и биохимической активности при последующей лиофи-

лизации или низкотемпературном хранении (Т. М. Сидякина, 1985).

Утрата ценных свойств биообъектов при переходе от их выращивания в лабораторных масштабах к культивированию в промышленных биореакторах также является серьезной биотехнологической проблемой. Масштабирование сопряжено с изменением целого комплекса физико-химических условий: гидродинамического режима, скорости поступления лимитирующих рост веществ и геометрических характеристик аппарата (габаритное отношение, форма сосуда). Неизбежно меняются такие параметры, как скорости аэрации, вращения мешалки, подачи пеногасителя, испарения воды и брызгоулавливания (о технологической стороне масштабирования см. гл. 2).

Все это может повлечь за собой, во-первых, прямое повреждение клеток и их гибель. Вероятно, именно по этой причине масштабирование не удается для многих культур растительных клеток (А. Х. Липский, 1985), например женьшеня (Т. Г. Корженевская, 1985). Во-вторых, происходит изменение направления автоселекции в популяции, так что в промышленном биореакторе часто преобладают не те формы, которые доминировали при культивировании в условиях лаборатории. Масштабный переход ведет к возрастанию численности клеток в популяции в 10^3 — 10^6 раз и более, что способствует накоплению в культуре даже очень редких мутантов.

Значительные трудности при культивировании клеток в масштабах промышленных биореакторов вызывает контаминация, т. е. попадание в культуру посторонней микрофлоры. Поддержание сред, оборудования, воздуха в стерильном состоянии — задача, нередко экономически невыгодная или даже в принципе невыполнимая. Проникающие в биореактор посторонние микроорганизмы конкурируют с его «коренными жителями», часто вытесняя их из биореактора. Если посторонние организмы принадлежат к тому же виду, что и культивируемые в нем клетки (например, в биореактор с мутантом *E. coli* — сверхпродуцентом треонина попадают клетки дикого штамма *E. coli*), то происходит расширение генного фонда популяции и образуются рекомбинантные штаммы. Рекомбинанты возникают также в том случае, если посторонние микроорганизмы несут плазмиды, способные к проникновению в клетки штамма-продуцента.

Для сохранения ценных свойств биообъектов при масштабировании проводится комплекс мероприятий.

1. Создание щадящих условий в биореакторе, максимально приближенных к условиям в лабораторном культиваторе.

2. Применение антимутагенов — веществ, снижающих частоту спонтанных мутаций.

3. Использование продуцентов с так называемыми многократно вырожденными мутациями (С. И. Алиханян, 1975; Н. С. Печуркин, 1978). Речь идет об организмах, несущих в геноме одновременно несколько независимых мутаций, каждая из кото-

рых сама по себе достаточна для фенотипического выражения биотехнологически ценного признака. Утрата этого признака наступает лишь при одновременной потере всех мутаций — событие на несколько порядков менее вероятное, чем единичное изменение в геноме.

4. Создание селективных условий, в которых преимущество получает интересующий нас штамм. Это магистральный путь борьбы как с утратой ценных свойств продуцентом, так и с ростом в биореакторе посторонней микрофлоры.

В крупномасштабных биотехнологических процессах используют способность того или иного соединения избирательно ингибировать рост посторонних микроорганизмов и мутантных вариантов, возникших из исходного штамма. Утилизирующие метанол бактерии, полученные путем плазмидного переноса генов, способны расти при концентрациях метанола, при которых подавляется развитие утративших плазмиду бактерий того же вида. Этот факт учитывается при культивировании бактерий на метаноле в больших реакторах (D. F. Kyder, D. Di Biasco, 1985).

Часто сравнительно незначительные изменения компонентного состава среды смещают баланс автоселекции в сторону преобладания в культуре того или иного варианта. Ген, кодирующий нитрогеназу, — фермент, ответственный за выделение водорода у пурпурных фототрофных бактерий, легко утрачивается в результате спонтанных мутаций. Если к среде культивирования, содержащей лактат, добавить аммоний как источник азота, доля утративших нитрогеназу мутантов составляет 25—40% общего числа клеток в популяции, при замене аммония на глутамат нитрогеназу теряет до 80% клеток (P. Allibert et al., 1984).

Создавая селективные условия, в некоторых случаях можно добиться «очищения» культуры, содержащей примесь посторонней микрофлоры при засеве в биореактор.

К сожалению, во многих случаях ни один из рассмотренных методов борьбы с утратой ценных свойств биообъектом на сегодняшний день не является эффективным, дающим 100%-ную гарантию. Единственный путь, остающийся в этих условиях, — частая смена головного ферментера с использованием свежего материала для каждого нового засева. Такой путь малоперспективен и нередко крайне неэкономичен. Первостепенной задачей поэтому является изучение свойств и динамики развития клеточных популяций с целью создания научно обоснованных методов их поддержания в высокоактивном состоянии.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТОВ

Магистральное направление биотехнологии — всемерная интенсификация производственных процессов. Это достигается не только на основе внедрения новых высокопродуктивных биообъектов, но и путем широкого применения эффективных технологических режимов. Необходимо подобрать подходящий субстрат (сырье), разработать конструкцию аппарата, оптимизировать условия культивирования биообъекта, обеспечить автоматический контроль за протеканием биотехнологического процесса, разработать способ выделения и очистки готового целевого продукта.

На этапе культивирования объекта биотехнология наиболее тесно смыкается с экономикой, что находит отражение в основных принципах этого этапа.

1. Принцип экономической обоснованности. Биотехнология внедряется только в те производственные процессы, которые не могут быть столь же эффективно и с теми же затратами реализованы средствами традиционной технологии. «Биотехнологический бум» не должен перешагивать экономически дозволенные рамки. Аминокислота лизин может быть сравнительно легко синтезирована химическим путем в оптически неактивной форме, но отделение L-изомера от оптического антипода — весьма трудоемкая процедура, поэтому L-лизин получают путем микробиологического синтеза.

2. Принцип целесообразного уровня технологических разработок (В. Е. Матвеев, 1985). Масштаб производства продукта, степень его очистки, уровень автоматизации производства — все это должно прямо определяться соображениями экономической выгоды, сырьевыми и энергетическими ресурсами, уровнем спроса готового продукта. Для получения препаратов медицинского назначения, которые требуются в количестве нескольких сотен граммов в год, целесообразно использовать небольшие биореакторы, крупномасштабное производство здесь себя не оправдывает. В большинстве современных микробиологических производств

стремятся к использованию чистых культур микроорганизмов и к полной стерильности оборудования, сред, воздуха, но в некоторых случаях продукт, удовлетворяющий потребителя (например, биогаз), может быть получен и без чистых культур, растущих в условиях нестерильности.

3. Принцип научной обоснованности биотехнологического процесса. Объективной необходимостью является создание новых технологий, опирающихся на научные знания, позволяющие заранее провести расчет параметров среды, конструкции биореактора и режима его работы.

4. Принцип удешевления производства (максимального снижения затрат). Хорошим примером служит использование в биотехнологических процессах «даровой» энергии Солнца, естественных биореакторов — природных водоемов — вместо ручкоточных аппаратов, в частности, для получения биомассы одноклеточных водорослей.

Изложенные принципы говорят о двуединой задаче биотехнологии: необходимо стремиться к созданию оптимальных условий для синтеза целевого продукта клетками биообъекта и в то же время вести производство в максимально экономичном режиме, при минимальных производственных затратах.

§ 1. Субстраты для культивирования биообъектов

Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост и развитие биообъектов, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемой частью питательной среды служит вода, все процессы жизнедеятельности протекают только в водной среде. Питательные вещества образуют в среде истинные (минеральные соли, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и т. д.) или коллоидные (белки, липиды, неорганические соединения типа гидроксида железа) растворы. Отдельные компоненты питательной среды могут находиться в твердом агрегатном состоянии — они могут всплывать на поверхность раствора (частицы угля, серы), равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный осадок. Жидкие углеводороды при внесении в воду формируют особую несмешивающуюся фазу. При твердофазном культивировании вода только увлажняет твердую поверхность субстрата. Вещества, необходимые для культивирования, могут представлять собой газы, растворимые в воде: хорошо (NH_3 , H_2S), умеренно (CO_2) или плохо (N_2 , O_2 , H_2 , CH_4).

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, т. е. включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки — мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. д. Подобные среды обычно готовят на водопроводной воде. Применяют также среды, приготовленные из чистых химических соединений в заранее определенных соотношениях, так называе-

мые синтетические среды. Смесь веществ, как правило, вносят в дистиллированную (иногда бидистиллированную) воду.

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

Компонентный состав сред зависит от пищевых потребностей биообъекта. Автотрофные организмы синтезируют органические вещества клеток из CO_2 и H_2O с утилизацией энергии света (фотоавтотрофы) или химических реакций окисления (хемоавтотрофы), поэтому питательные среды для таких биообъектов могут не содержать органических соединений. Очень простые по составу среды необходимы для культивирования цианобактерий: источником энергии служит свет, углерода — CO_2 (или карбонат), азота — N_2 атмосферы (многие цианобактерии способны к его усвоению). Смесь минеральных добавок в последние годы вносят в виде тех или иных комбинаций из сельскохозяйственных удобрений.

Не сложен рецепт приготовления среды также для хемоавтотрофных организмов, вызывающих окисление металлов в рудах и тем самым переводящих их в растворимое состояние (выщелачивание металлов из руд). Породу, из которой требуется извлечь остаточные количества ценного металла, обливают водой, а соответствующие микроорганизмы развиваются в породе без каких-либо дальнейших добавок.

Во многих разработках используют биообъекты, требующие органических источников углерода и (или) энергии. Раньше такие организмы называли гетеротрофами, ныне они подразделяются на органоавтотрофы (употребляющие органические вещества как источник энергии), литогетеротрофы (использующие органические вещества как источник углерода) и органогетеротрофы, для которых органические вещества — источник и углерода, и энергии (Р. Стейниер и др., 1979). Применяемые в биотехнологии органические вещества разнообразны и отражают специфику объекта и критерии технологической и экономической целесообразности. Примеры наиболее распространенных субстратов даны в табл. 1.

С технико-экономической точки зрения субстрат представляет собой сырье для получения целевого продукта. Сырье должно быть недефицитным, недорогим, по возможности легко доступным. Применяют и дорогостоящее сырье, но в этом случае требуется покрытие расходов прибылью от сбыта продукта.

Хорошим примером недефицитного и дешевого сырья служит меласса, побочный продукт производства сахара (табл. 1). Однако

Таблица 1. Питательные субстраты, широко применяемые в биотехнологии (по В. Sikyta, 1984, и Р. Biely, 1985)

Субстрат	Назначение	Краткая характеристика	Сырье для получения субстрата
1. Сахара			
Глюкоза	Источник углерода и энергии	Быстро ассимилируется, добавляют ко многим культурам-продуцентам сложных органических соединений	Крахмал, целлюлоза (химический или ферментативный гидролиз)
Сахароза	То же	Основной субстрат при биосинтезе антибиотиков, аминокислот, органических кислот	Сахарный тростник, сахарная свекла, канадский клен
Лактоза	—»—	Усваивается лишь некоторыми организмами, не утилизируется большинством дрожжей	Молочная сыворотка, отделяемая в процессе изготовления масла, творога, сыра
Ксилоза	—»—	Усваивается многими бактериями и дрожжами рода <i>Candida</i> ; в стадии разработки — получение генноинженерных штаммов <i>S. cerevisiae</i> , утилизирующих ксилозу	Ксилан, основной компонент растительных гемицеллюлоз (гидролиз)
Крахмал	—»—	Усваивается после гидролиза разной глубины (до декстринов, мальтозы, глюкозы) или непосредственно при наличии у микроорганизма амилаз	Картофель, кукуруза, пшеница, рожь, ячмень, рис, маниок, бананы и т. д.
Целлюлоза	—»—	В большинстве случаев для утилизации необходим гидролиз и, как правило, освобождение от лигнина, гемицеллюлоз и восков	Разнообразное растительное сырье. Наибольшее значение имеет использование древесины (ель, сосна, даурская лиственница, бамбук, эвкалипт) и сельскохозяйственных отходов (солома, кукурузная кочерыжка, стебли хлопчатника, отходы после бланшировки бобовых)
Ксилан	—»—	Подлежит гидролизу до ксилозы (с примесью других сахаров) или может утилизироваться непосредственно при наличии у микроорганизма ксиланаз	Преобладающий компонент гемицеллюлоз. Аналогичное применение возможно для других компонентов гемицеллюлоз (например, арабинана)
2. Спирты			
Этанол	—»—	Доступный и сравнительно недорогой субстрат, как поверхностно-активное вещество усиливает вспени-	Разнообразные источники — от сахаристых субстратов (сбраживание) до продук-

Субстрат	Назначение	Краткая характеристика	Сырье для получения субстрата
Метанол	Источник углерода и энергии	вание культуральной жидкости Сходен с этанолом, также экономичен, как субстрат, но более летуч и токсичен	тов гидролиза древесины и компонентов нефти и газа (химический синтез) Разнообразное сырье, в первую очередь — растительное (гидролиз)
3. Углеводороды			
C ₁ —C ₉ -Алканы	То же	Применяют главным образом метан, ассимилируемый многими бактериями, но не дрожжами	Природный газ, получение C ₂ —C ₉ -алканов затруднено, требует очистки
C ₁₀ —C ₂₀ -Алканы	—»—	Наиболее подходящая для утилизации группа углеводородов; используется бактериями, дрожжами, мицелиальными грибами	Нефть и газовый конденсат
Алканы с числом углеродных атомов более 20	—»—	Используются с большим трудом, так как находятся в твердом состоянии	Нефть и газовый конденсат
4. Азотсодержащие соединения			
(NH ₄) ₂ SO ₄	Источник азота	Хорошо растворим в воде, технический (NH ₄) ₂ SO ₄ содержит не менее 20,7% азота	Минеральные источники сырья
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Источник азота и фосфора	Технический (NH ₄) ₂ HPO ₄ сильно загрязнен (NH ₄) ₂ SO ₄ и содержит около 20% азота и 50% P ₂ O ₅	То же
NH ₃	Источник азота	Используют в виде водного раствора или газа	—»—
Мочевина	Источник азота	Относительно дорогой и поэтому редко используемый субстрат	—»—
5. Субстраты неопределенного состава			
Меласса	Источник углерода и энергии	Излюбленный субстрат для биотехнологических процессов, высокий уровень содержания сахаров (сахарозы, глюкозы)	Побочный продукт в производстве сахара-сырца и рафинированного сахара
Ячмень и продукты его переработки (сусло, солод, солодовый экстракт)	То же	Наибольшее применение находит солодовый экстракт	Ячмень
Сульфитные щелока	Источник углерода, энергии, минеральных солей	Содержит лигнин, сахара, уксусную и муравьиную кислоты, а также SO ₂ , подлежащий удалению. Применяют, например, для получения этанола с помощью кормовых дрожжей	Древесина, побочный продукт ее переработки

Субстрат	Назначение	Краткая характеристика	Сырье для получения субстрата
Гидролизаты, древесины, со- ломы и др.	Источник углерода, энергии, минераль- ных солей	Состав зависит от вида сырья и условий гидролиза, среди сахаров преобладают пентозы, что благоприятст- вует росту кормовых дрож- жей	Древесина, травя- ная масса и т. д. Мяг- кий гидролиз. Гемি- целлюлозы распада- ются до моно- и оли- госахаридов
Растительные масла и живот- ные жиры	Источни- ки углеро- да и энер- гии	Метаболизируются мно- гими микроорганизмами, служат высокоэффектив- ными источниками энергии	Растительное и жи- вотное сырье
Дрожжевой экстракт	Источник углерода, энергии, азота, ми- неральных солей	Смесь аминокислот, ли- пидов, витаминов и сахаров	Получают из пив- ных или пекарских дрожжей путем авто- лиза
Соевая мука	То же	Богата белками, фосфор- ными соединениями, жи- рами	Получают из сое- вых бобов после уда- ления масла

в последние годы спрос на мелассу значительно превышает имею-
щиеся ресурсы, поэтому ее стремятся заменить другими органи-
ческими субстратами (В. Sikyta, 1984a). Распространенными
источниками углерода и энергии являются компоненты нефти и
природного газа. В состав сырой нефти входит большое количество
разнообразных органических (предельные, непредельные, арома-
тические углеводороды и их производные) и неорганических
(соединения серы) веществ, микроорганизмы обычно не способны
усваивать все фракции одновременно, хотя, как отмечалось, выве-
ден штамм псевдомонад, утилизирующий основные компоненты
сырой нефти. Это обуславливает необходимость разделения нефти
на фракции, что достигается путем ее перегонки или крекинга
(превращения длинноцепочечных углеводородов в короткоцепо-
чечные).

Если компоненты нефти служат сырьем для получения пище-
вого (кормового) белка или препаратов медицинского назначения,
необходима их тщательная очистка от канцерогенных веществ.
Наилучшим субстратом из числа компонентов нефти являются
n-алканы, особенно жидкие с числом углеродных атомов от 10
до 20, к их утилизации способно большинство бактерий и дрож-
жевых грибов. Практически все сказанное о нефти относится и
к природному газу — сложной смеси органических (углеводороды
и их производные) и неорганических (CO_2 , CO, H_2 , H_2S , SO_2 ,
 NH_3) веществ. В его составе имеются пары углеводородов
 C_{10} — C_{20} , отделяемых в виде газового конденсата.

Однако ограниченность ресурсов нефти и газа вынуждает
биотехнологов изыскивать иные, в первую очередь возобновля-
емые источники сырья. Большое внимание уделяют различным

видам растительной массы: плодам, сокам, клубням, травяной массе, древесине. Применяют отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей и бумажной промышленности, что позволяет реализовать с помощью биотехнологии принцип безотходного производства.

Половину высушенной растительной массы составляет целлюлоза — самый распространенный биополимер (P. J. Weimer, W. M. Weston, 1985). Как полисахарид, целлюлоза представляет собой ценный источник углерода и энергии. Необходимым этапом подготовки этого сырья к биотехнологическому использованию является гидролиз до простых водорастворимых сахаров (глюкоза, целлобиоза), что до сих пор представляет сложную задачу. Наибольшие трудности возникают при утилизации древесины, где целлюлоза образует комплекс с гемицеллюлозами и лигнином. Лигнин сильно затрудняет и химический, и ферментативный гидролиз целлюлозы, так как препятствует доступу к ней реагентов и катализаторов, в случае ферментативного гидролиза лигнин активно адсорбирует целлюлозолитические ферменты, выводя их из строя (А. А. Клесов и др., 1985; В. И. Огарков и др., 1985; P. J. Weimer, W. M. Weston, 1985).

Поэтому целесообразно отделять гемицеллюлозы и лигнин от целлюлозы введением этапа предгидролиза. Дополнительной задачей этого этапа является разрыхление целлюлозы, разрушение ее кристаллической структуры, что значительно облегчает ее последующее расщепление. Предгидролиз осуществляют обработкой растительного материала щелочами или кислотами в низких концентрациях, в том числе угольной кислотой; гидролиз ведут в атмосфере паров воды и CO_2 при 200°C . Получаемый на этом этапе предгидролизат сам по себе представляет ценный субстрат для биотехнологических целей. Широко распространенным методом отделения лигнина (делигнификации древесины) служит обработка SO_2 , при этом образуется побочный продукт, так называемые сульфитные щелока, которые используются как субстрат в микробиологическом производстве (табл. 1).

Последующий гидролиз целлюлозы проводят с помощью концентрированных кислот, при высоких температурах и давлении, с применением оборудования из прочных и коррозионно-стойких материалов. В поисках методов, позволяющих упростить и удешевить оборудование, биологи в последние годы обращаются к «газообразным кислотам» — SO_2 (который при взаимодействии с водой образует H_2SO_3) и CO_2 (переходящий в H_2CO_3). Эффективность и полнота гидролиза целлюлозы резко возрастают при радиационно-химической обработке целлюлозы в атмосфере CO_2 . Это объясняется действием продуктов радиолитического распада CO_2 (В. И. Огарков и др., 1985). Перспективным направлением является также ферментативный гидролиз целлюлозы.

Гемицеллюлозы, основным компонентом которых служит ксилан (полимер, построенный из остатков ксилозы и небольшого

количества арабинозы и глюкуроновой кислоты), — это не только отход, отделяемый при гидролизе растительного сырья, но они имеют и самостоятельное значение в качестве биотехнологического сырья. Ксилан — второй по распространенности растительный биополимер. Химический гидролиз ксилана происходит с образованием веществ, токсичных для микроорганизмов (P. Bielý, 1985). В связи с этим в последние годы осваивают ферментативный гидролиз ксилана.

Биотехнология не ограничивается применением растительных отходов. Наблюдается тенденция к созданию биотехнологических цепочек, когда отходы или побочные продукты одного биотехнологического процесса используются как дешевое сырье для другого. На отходах, остающихся при микробиологическом получении этанола, можно выращивать кормовые дрожжи. Разработан способ получения биомассы, при котором на гидролизатах растительного сырья выращивают дрожжи, а фильтрат культуральной жидкости затем идет на синтез грибного белка. Известен также способ производства дрожжевой массы на фильтрах культуральной жидкости грибов (И. В. Стахеев и др., 1985). Предполагают использовать биомассу одного вида организма как субстрат для культивирования другого. Преимущество такого подхода в том, что малоценное сырье, на котором не растет непосредственно продуцент, может служить подходящим субстратом для культивирования клеток, «скармливаемых» этому продуценту.

В последние годы все возрастающее значение приобретает твердофазное культивирование, позволяющее резко снизить издержки производства, связанные с конструированием и эксплуатацией биореакторов. Рассматриваемый метод культивирования восходит к глубокой древности: в Японии он издавна известен как способ производства кодзи — продукта, аналогичного по свойствам ячменному солоду. Традиционная японская пища мисо готовится путем заражения твердой массы соевых бобов грибами рода *Aspergillus*, предварительно выращенными на зернах риса. Большие надежды на твердофазное культивирование возлагают в связи с биоконверсией растительного сырья, в том числе прямого превращения целлюлозы, ксилана, крахмала, хитина в этанол, ацетат и другие низкомолекулярные вещества.

Интересной идеей является освоение газообразных питательных сред. В газообразном состоянии при комнатной температуре находятся многие биотехнологические субстраты; список этих веществ удлинится еще более при культивировании термофильных и особенно экстремально термофильных микроорганизмов. Такие субстраты, как H_2 , CH_4 , CO , плохо растворимы в воде, поэтому для решения проблемы массопередачи из газа в жидкость их приходится пропускать через культуральную среду. Известно в то же время, что микроорганизмы могут длительное время жить и развиваться во взвешенном состоянии — в виде аэрозолей в увлажненном воздухе или смеси газов,

содержащей необходимый для культивирования субстрат. Представляется заманчивым создание газофазного биореактора.

Таким образом, биотехнология в настоящее время все более ориентируется на разнообразные виды недорогого, доступного и возобновляемого сырья, наиболее важным видом которого является растительная масса. При конверсии субстратов в биотехнологических процессах стремятся наладить безотходное производство, когда отходы одного процесса служат сырьем для последующего.

§ 2. Принципы действия и конструкции биореакторов

Биотехнологические процессы принципиально не отличаются от процессов химического синтеза. Для них характерны такие этапы, как загрузка субстратов для реакций синтеза, превращения субстратов, отделение и очистка целевого продукта. Процессы обоих типов могут быть периодическими и непрерывными. Существуют принципы, общие по форме, но различающиеся по практической реализации. В первую очередь, это *принцип масштабирования* — поэтапного увеличения объема аппаратов и *принцип однородности* физико-химических условий — температуры, pH, концентрации растворенных веществ, включая O_2 и другие газы, во всем объеме аппарата.

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

Расчет системы перемешивания требует ясного понимания особых свойств среды в биореакторе. Клетки, часто соединенные в длинные цепочки, и особенно гифы грибов или актиномицетов значительно увеличивают вязкость среды. Помимо этого, жидкость, содержащая нитевидные образования, как бы приобретает жесткую арматуру. Усилия ниже определенной (пороговой) величины, приложенные в такой жидкости (например, давление

лопастей мешалки), не вызывают ее перемешивания. Подобные свойства не характерны для жидких сред, не содержащих биообъекта, поэтому в биотехнологии предъявляются особые требования к системе перемешивания, в частности, приходится резко повышать мощность мешалки.

Повышение мощности и соответственно ускорение вращения мешалки создают другую проблему. Приложение значительных усилий к жидкости может повлечь за собой угнетение роста биообъекта, снижение эффективности синтеза целевого продукта, повреждения и гибель клеток.

Существенные различия между биотехнологическими и химико-технологическими процессами касаются массопередачи между газовой и жидкой фазами в реакторе. Многие биотехнологические процессы относятся к числу *аэробных* — они требуют для своего осуществления *аэрации*, т. е. снабжения кислородом. Для аэрации культуральной среды используют воздух или воздух, обогащенный кислородом, реже чистый кислород. В ходе метаболических процессов выделяются газообразные продукты, в первую очередь CO_2 , которые подлежат удалению. Процессы, протекающие без доступа кислорода (анаэробные), нередко зависят от газообразных субстратов или требуют отвода газообразных продуктов жизнедеятельности.

Системы газоснабжения и газоотвода, важнейшим примером которых служат аэраторы — установки для обеспечения кислородом, должны функционировать эффективно, надежно и в то же время экономично. Технологию приходится балансировать между угрозой перерасхода кислорода, без необходимости пропускаемого через жидкость, уже насыщенную этим газом, и риском истощения O_2 в среде, особенно если клетки активно потребляют O_2 для дыхания.

Кислород плохо растворим в воде: его равновесная концентрация в питательных средах при 26—30°C близка к 0,21 моль/м³ (0,0007%). В то же время кислород относится к числу быстро расходуемых субстратов, и поэтому его запас в жидкости без подпитки исчерпывается за несколько секунд. Все это обуславливает необходимость слаженной работы систем аэрации и перемешивания и постоянного контроля за этими системами.

Во многих случаях потребность в O_2 меняется по мере развития культуры. Аэратор должен вовремя реагировать на эти изменения, увеличивая или уменьшая подачу O_2 . В некоторых производственных процессах концентрацию O_2 в среде поддерживают на уровне, не обеспечивающем максимальное потребление клетками (лимитирование роста клеток кислородом), и тогда необходима точная регулировка скорости его подачи в биореактор.

Фундаментальной характеристикой массопередачи между газом и жидкостью служит объемный коэффициент массопередачи соответствующего газа. Этот коэффициент показывает, какова скорость переноса молекул газа из газовой фазы в жидкую при заданной разности концентраций газа между двумя фазами.

Объемный коэффициент массопередачи зависит от характеристик среды культивирования и аппарата. Он существенно меняется при внесении в среду биообъекта, обычно в сторону увеличения. Это объясняется активным поглощением газа (в рассматриваемом случае O_2) клетками, что способствует поступлению его новых порций в жидкость из газовой фазы.

Увеличение объемного коэффициента массопередачи особенно характерно для разработанных в последние годы биотехнологических процессов, поскольку: 1) применяют концентрированные популяции клеток и 2) широко используемая иммобилизация клеток и их компонентов на носителях ведет к активации поглощения O_2 из среды (D. N. Bull, 1983). Коэффициент массопередачи представляет собой важнейшую характеристику процесса, исходя из которой проводят расчет, оптимизацию и масштабирование уровня аэрации среды для культивирования биообъекта (К. Г. Федосеев, 1977; В. В. Бирюков, Л. М. Кузьмина, 1984; В. Н. Тарасов, 1984; В. В. Бирюков, В. М. Кантере, 1985; M. Sobotka, 1984).

Оценка этого коэффициента, проводимая по скорости поглощения кислорода с сульфитом (сульфитный метод) или с глюкозой при участии глюкозооксидазы (глюкозооксидазный метод) в отсутствие биообъекта, часто дает ошибочные результаты. Учет влияния растущей популяции клеток на коэффициент массопередачи O_2 , необходимый для корректных инженерно-технологических расчетов, достигается с помощью прямых методов регистрации динамики поступления и расхода кислорода, в первую очередь, с использованием кислородных датчиков (В. Н. Тарасов, 1984; M. Sobotka, 1984).

Теплообмен представляет собой также важную составную часть процессов, протекающих в биореакторе, поскольку жизнедеятельность и метаболическая активность биообъекта в существенной мере зависят от температуры. Узкий диапазон температур, оптимальный для биотехнологического процесса, диктуется: 1) резким спадом активности ферментов по мере снижения температуры и 2) необратимой инактивацией (денатурацией) биологических макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) при повышении температуры до определенного уровня.

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

Расчет и оптимизация системы теплообмена усложняется наличием в биореакторе большого количества контактирующих поверхностей. Теплообмен происходит между клеткой и питатель-

ной средой, между средой и стенкой аппарата, между стенкой и охлаждающей жидкостью рубашки биореактора, между этой жидкостью и внешней стенкой рубашки, между рубашкой и наружной средой. Система теплообмена должна чутко реагировать на изменения теплопродукции, происходящие в ходе культивирования биообъекта, поддерживать температуру на постоянном уровне (режим термостатирования) или контролировать ее изменения по заданной программе. Например, на первых этапах роста культуры биореактор прогревают, а далее встает задача отвода избыточной теплоты, выделяемой в процессах жизнедеятельности.

Теплообмен описывается уравнением, связывающим теплоту Q , переданную в единицу времени от одной фазы к другой (в рассматриваемом случае — между внутренним объемом реактора и окружающей средой или между этим объемом и системой теплообмена), с площадью поверхности теплообмена A и межфазной разностью температур ΔT :

$$Q = UA\Delta T. \quad (1)$$

Коэффициент теплопередачи U соответствует количеству теплоты, которая передается в единицу времени через единичную поверхность при разности температур в 1°C .

Из уравнения следует, что повысить скорость передачи теплоты между внутренним объемом и системой теплообмена, увеличить эффективность работы этой системы можно путем: 1) повышения коэффициента теплопередачи; 2) увеличения поверхности теплообмена; 3) увеличения разности температур. Первые два пути связаны с инженерно-конструкторскими разработками. Коррозия стенок биореактора или их загрязнение снижают коэффициент теплопередачи. Отсюда вытекает необходимость изготовления аппарата из неподверженных коррозии материалов и его поддержания в чистоте (К. Г. Федосеев, 1977; D. N. Bull, 1983). Что касается разности температур между реактором и теплообменными устройствами, то важный путь ее повышения состоит в использовании термофильных микроорганизмов и их ферментов (см. гл. 1, § 1).

Серьезной проблемой для аэрируемых процессов в биотехнологии является вспенивание культуральной среды — образование на ее поверхности слоя из пузырей. *Пенообразование* связано с наличием в среде поверхностно-активных веществ (ПАВ), к числу которых относятся продукты распада жиров — мыла, а также белки. Белковые вещества содержатся в среде как питательные субстраты (белки соевой, кукурузной муки и т. д.) или представляют собой продукты жизнедеятельности организмов. Как правило, ПАВ включают как полярные (или ионные), так и неполярные группировки. Заряженные группы имеют сродство к воде и локализуются в водной фазе, а нейтральные выталкиваются из воды в воздушную фазу. Это придает ПАВ ориентацию на границе раздела фаз вода/воздух. Встраиваясь в стенки газовых пузырей, ПАВ значительно удлиняют время их жизни.

Пенный слой поверх среды культивирования в биореакторе имеет двоякое значение. Пена способствует росту многих аэробных микроорганизмов. В пенном слое — «кислородном коктейле» — наибольший прирост дают дрожжи. Внедряясь в границу раздела вода/воздух, пенообразующие ПАВ стимулируют массопередачу между этими фазами, снижая затраты на перемешивание и аэрацию. Нежелательные последствия вызывает избыточное пенообразование. Оно ведет к сокращению полезного объема биореактора, создает угрозу заражения культуры посторонней микрофлорой. Поэтому необходимой составной частью реактора служит система *пеногашения*.

Выше рассматривались методы борьбы с контаминацией и нежелательной автоселекцией микробных культур, не связанные со стерилизацией аппарата (см. гл. 1, § 5). Это относится к мероприятиям второго эшелона, на практике стремятся вообще не допустить в биореактор чужеродную микрофлору, создав в нем соответствующие условия. Система *стерилизации* представляет собой специфический элемент биореактора, не имеющий аналогов в аппаратах химической технологии. Устранение посторонней микрофлоры из реактора до введения в него штамма-продуцента, поддержание чистоты культуры на всем протяжении биотехнологического процесса, надежная стерилизация питательных сред, добавочных компонентов, титрантов, пеногасителей, подаваемого в биореактор воздуха — все это рассматривается как *принцип асептики* биотехнологического производства (В. Е. Матвеев, 1985). Этот принцип выдвинут еще Луи Пастером в 60-е годы XIX в.

Все более широкое применение в биотехнологии находит *принцип дифференцированных режимов* культивирования: разные этапы одного процесса целесообразно осуществлять при различных условиях, варьируя такие параметры, как температура, pH среды и т. д. Нередко к повышению эффективности биотехнологического процесса ведет разобщение роста культуры и синтеза целевого продукта. Показательный пример — технологический способ стабилизации генноинженерных мутантов. Полученные путем плазмидного переноса сверхпродуценты тех или иных соединений, как правило, отстают в росте от представителей дикого типа, более экономно расходующих материальные и энергетические ресурсы клетки. Чтобы избежать вытеснения сверхпродуцента диким штаммом, плазмиду, отвечающую за сверхпродукцию, ставят под контроль термолabileного репрессора. Генно-инженерный штамм выращивают при пониженной температуре, при которой репрессор подавляет синтез целевого продукта. Плазмидный штамм не расходует материал на его синтез и растет с нормальной скоростью. После накопления достаточного количества клеток в биореакторе температуру повышают до уровня, при котором наступает инактивация репрессора, и вся масса клеток с активно функционирующими плазмидами «выстреливает» целевой продукт (R. Siegel, D. D. Ryu, 1985).

Таким образом, в согласии с основными принципами реализации биотехнологических процессов современный биореактор должен обладать системами: а) эффективного перемешивания и гомогенизации питательной среды; б) обеспечения доступа и быстрой диффузии газообразных агентов (наиболее часто речь идет о системе аэрации среды); в) теплообмена, отвечающего за поддержание температуры внутреннего объема биореактора и(или) за ее контролируемые изменения; г) пеногашения; д) стерилизации сред, аппаратуры и воздуха; е) контроля и регулировки процесса.

§ 3. Системы перемешивания и аэрации

Устройство и механизм действия систем перемешивания и аэрации варьируют и составляют важный принцип классификации биореакторов различных типов. Как сложные многопараметровые аппараты, биореакторы могут быть классифицированы и по другим критериям: по размеру и целевому назначению (лабораторные, опытно-промышленные или пилотные и промышленные), по режиму работы (периодические и непрерывно действующие), по условиям культивирования (аэробные и анаэробные, мезофильные и термофильные, для поверхностного и глубинного культивирования, аппараты для жидких питательных сред, твердофазные и газофазные). Эти критерии будут рассмотрены ниже, здесь же речь пойдет о промышленных установках периодического действия, предназначенных для глубинного культивирования — культивирования биообъекта в жидкой питательной среде по всему объему реактора.

По способу перемешивания и аэрации биореакторы подразделяются на *аппараты с механическим, пневматическим и циркуляционным перемешиванием* (В. Sikyta, 1984, в). Реакторы классифицируют также, как аппараты с подводом энергии к газовой фазе, жидкой фазе и комбинированные (К. Г. Федосеев, 1977; В. А. Быков и др., 1985). Эти классификации частично совпадают. С точки зрения конструкции более удобной представляется первая, которая рассматривается в книге.

Аппараты с механическим перемешиванием. Эти аппараты имеют механическую мешалку, состоящую из центрального вала и лопастей (обычно 6, реже 8) различной формы (прямых или изогнутых). Эффективное перемешивание жидкости в больших объемах обеспечивается только в том случае, если мешалки многоярусны, лопасти расположены в несколько этажей.

В систему перемешивания входят также отражательные перегородки — узкие металлические пластины, прикрепленные к внутренним стенкам реактора. Эти перегородки предотвращают возникновение вихоревых течений, вращающихся вокруг вертикальной оси, и способствуют образованию вихревого, равномерно распределенного по всему объему. Иногда отражательные перегородки неприменимы, поскольку они обрастают микроорганизмами, в част-

ности мицелиальными грибами, что резко ухудшает условия аэрации и перемешивания в аппарате. Для выращивания грибов используют мешалки с плоскими лопастями, не разрывающие мицелий. Очень нежное, медленное перемешивание производится в аппаратах, предназначенных для культивирования клеток животных и растений.

Аэрация может осуществляться путем барботажа — подачи воздуха снизу через барботер, горизонтальную трубку с отверстиями (щелями). Разбрызгиванию воздуха (или другого аэрирующего газа) в виде мелких пузырьков способствует механический вибратор, установленный в непосредственной близости от барботера. Существуют аппараты, в которых вибратор, совершающий вертикальные колебания с амплитудой 0,1—3 мм и частотой 50 Гц, служит единственным устройством для перемешивания жидкости. Такая система обеспечивает высокий уровень асептики, низкие энергозатраты и сравнительно мало травмирует культивируемые клетки (В. Sikyta, 1984 в).

В некоторых аппаратах используется полая мешалка, воздух поступает в среду культивирования через нижний конец ее вала и полые лопасти. Вращение мешалки способствует диспергированию воздуха в жидкости. Хороший газожидкостный контакт в таком биореакторе обеспечивается также спиральной траекторией пузырьков газа. В аппаратах с поллой мешалкой (например, в немецких биореакторах Вальдгоф) часто непосредственно над лопастями аэрирующей мешалки устанавливают диффузор — открытый снизу и сверху цилиндр, который делит объем биореактора на два отсека — внутренний и внешний по отношению к стенкам диффузора.

Диффузор усиливает разрежение, создаваемое при вращении мешалки в верхней части аппарата, где поверхность жидкости приобретает вид глубоко вогнутого мениска, и тем самым способствует дополнительному подосу воздуха сверху (самовсасывающий эффект мешалки) и циркуляции жидкости в вертикальной плоскости аппарата. Аппараты подобного типа широко применяются в производстве кормовых дрожжей, спирта и в других производствах с использованием дрожжей. Диффузор может устанавливаться также в аппаратах с обычной (не поллой) мешалкой и барботажной аэрацией. В этом случае диффузор также благоприятствует аэрации и перемешиванию, позволяя ограничиться одним ярусом лопастей мешалки (В. А. Быков и др., 1985).

Аппараты с механическим перемешиванием — наиболее распространенная конструкция в современной микробиологической промышленности. Перспективы их дальнейшего применения связаны с высокой скоростью массопередачи кислорода и значительной экономией мощности (В. А. Быков и др., 1985; I. Adler et al., 1984).

Аппараты с пневматическим перемешиванием. В аппаратах пневматического типа мешалка отсутствует, перемешивание жид-

кости осуществляется пузырьками газа. Простейший аппарат подобного типа — барботажная камера, в которой распыленный барботером воздух, поднимаясь снизу вверх, перемешивает культивационную среду. Скорость массопередачи между газом и жидкостью в таком аппарате намного ниже, чем в аппаратах с механическим перемешиванием. Для преодоления этого недостатка вводятся модификации. Перемешивание и аэрация усиливаются с помощью вращающихся дисков с отверстиями, установленных вблизи барботера, или с помощью придонных пропеллеров.

Классический так называемый эрлифтный (air lift — подъем воздуха) аппарат дополнен диффузором, нижний обрез которого находится непосредственно над барботером (рис. 7). Столб жидкости внутри диффузора «расталкивается» пузырьками воздуха, плотность ее уменьшается, а объем увеличивается. Жидкость переливается через верхний край диффузора вниз, что приводит к перемешиванию и аэрации объема реактора вне диффузора. Возможен вариант аппарата, где воздух подается не во внутренний, а во внешний по отношению к диффузору объем среды. Существует также вариант с выносным циркуляционным контуром. Речь идет о широкой трубе, огибающей биореактор, по которой жидкость перетекает из верхней части биореактора в нижнюю.

На пневматическом перемешивании основаны многие колоночные биореакторы, разделенные горизонтальными перегородками на этажи (некоторые колоночные аппараты относятся к циркуляционному типу). Металлические горизонтальные перегородки имеют узкие отверстия. Основное назначение перегородок — интенсификация аэрации и перемешивания. Перегородки с отверстиями позволяют также бороться с укрупнением газовых пузырьков по мере их продвижения вверх, поэтому они приобретают особое значение для аппаратов большой высоты. Таким путем уменьшается также угроза избыточного пенообразования в реакторе.

Пневматические биореакторы, характеризующиеся плавным перемешиванием жидкости, зарекомендовали себя при культивировании клеток животных и растений. В условиях этих «тихоходных» установок в культурах растительных клеток пробуждаются биосинтетические способности, свойственные целым растениям. Клетки *Digitalis lanata* в эрлифтном биореакторе образуют β -метилдигоксин, ценное

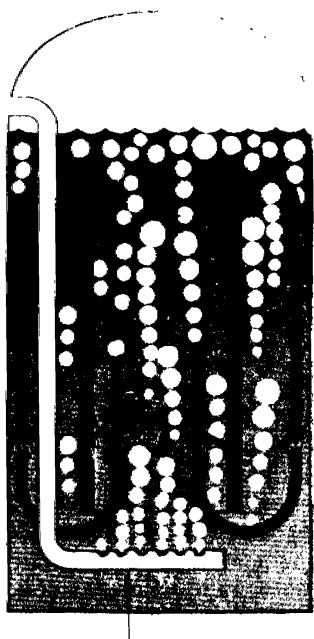


Рис. 7. Эрлифтный биореактор:

синие стрелки — движение жидкости; 1 — диффузор; 2 — барботер

средство для лечения заболеваний сердца (А. W. Aftermann et al., 1985). Пневматические аппараты привлекают также простотой конструкции (полая колонна) и малыми энергозатратами (В. А. Быков и др., 1985). Барботажные колонны применяют для аэробной обработки промышленных отходов с помощью плесневых грибов (А. R. Webb, 1984). В то же время «тихоходность» становится серьезным недостатком при биотехнологических процессах, требующих интенсивного перемешивания, или в биореакторах с вязкими средами, используемыми для культивирования грибов, актиномицетов.

Преодоление «тихоходности» возможно в соплоконусных реакторах. Мощная струя воздуха врывается в культуральную среду через отверстия (сопла, форсунки) в центре дна аппарата, имеющего форму конуса. Биосинтез целевого продукта происходит преимущественно в пенном слое.

Аппараты с циркуляционным перемешиванием. Биореакторы циркуляционного (гидродинамического) типа содержат устройства (насосы, эжекторы), создающие направленный ток жидкости по замкнутому контуру. Жидкость увлекает за собой пузырьки газа. Насос для циркуляции культуральной жидкости может соседствовать с барботером (сочетание пневматического и циркуляционного перемешивания). В аппаратах типа «падающей струи» (рис. 8) культуральная жидкость по трубе, соединяющей дно реактора с его верхней частью, подается с помощью насоса 1 в сопла на крышке аппарата. Пузырьки воздуха захватываются жидкостью, струящейся сверху вниз, в полости биореактора. В аппаратах типа «погруженной струи» насос перекачивает культуральную жидкость сверху вниз по внешней трубе, и она врывается внутрь реактора через сопло в дне аппарата. Воздух подсасывается через эжекторы в стенках внешней трубы.

Создан циркуляционный реактор, в котором газ подается вместе с жидкостью через специальный эжектор, размещенный наверху аппарата. Газ и жидкость перемешаются вниз по диффузору и далее вверх по простенку между диффузором и стенкой биореактора (Е. N. Nandorf et al., 1985). В аппарате обеспечивается высокоэффективная массопередача между газом и жидкостью. Его предполагают исполь-

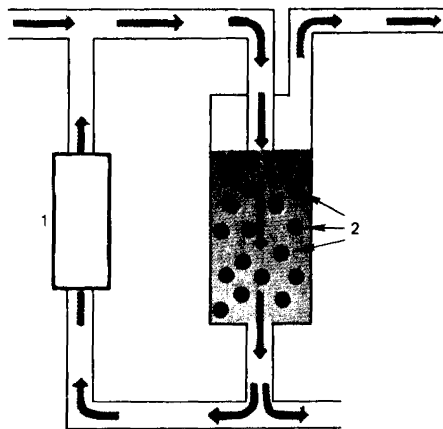


Рис. 8. Циркуляционный биореактор (принцип «падающей струи») с твердой насадкой, предназначенный для получения биогаза:

черные стрелки соответствуют потокам жидкости; серые — потоку биогаза, образуемого культурой: 1 — насос; 2 — частицы твердой насадки

зовать для биотехнологических процессов, требующих интенсивной аэрации или подачи различных малорастворимых газов.

Многие циркуляционные биореакторы, подобно пневматическим, разделены перфорированными перегородками на горизонтальные секции. Такую конструкцию предпочитают также в анаэробных биопроцессах. Перспективность этих аппаратов связана с высокой надежностью и простотой. Поскольку жидкость и воздух (для аэробных процессов) часто подаются независимо в каждый из этажей (секций) аппарата, он по существу эквивалентен целой системе биореакторов, поставленных друг на друга. Это позволяет экономить площадь и обеспечивает возможность проведения многоэтапного процесса, в том числе при дифференцированных режимах культивирования, в рамках одного аппарата (В. А. Быков и др., 1985).

Аппараты циркуляционного типа часто заполняют твердыми частицами (насадкой). Такие частицы улучшают перемешивание в биореакторе, при длительном непрерывном культивировании препятствуют обрастанию его стенок, а также способствуют диспергированию воздуха в жидкости. Клетки растут в виде пленки на поверхности твердых частиц песка (M. Kurt et al., 1985), кусков обожженной глины (W.M. Murray, 1985), гранул полимерных материалов (J. Elkington, 1983). Прикрепление к твердой поверхности стимулирует развитие многих организмов, в частности грибов и актиномицетов. При получении микробной массы на основе сельскохозяйственных отходов используют насадку из упругих полимерных частиц, рыхло заполняющих полость аппарата. Частицы содержат поры и полости (J. Elkington, 1983; R. Samson et al., 1984). По окончании биотехнологического процесса частицы «выжимают», при этом собирают выдавленную биомассу, а частицы вновь загружают в биореактор. Таким же путем можно культивировать растительные клетки, например *Capsicum frutescens* (J. Elkington, 1983). От биореакторов с твердой насадкой — один шаг к аппаратам, содержащим иммобилизованные на носителе клетки или их ферменты (гл. 4).

Таким образом, по способам перемешивания и аэрации различают биореакторы трех основных типов, каждый из которых допускает многообразные варианты. Несмотря на то, что определенное предпочтение отдается новейшим конструкциям аппаратов — соплоконусным, колоночным, с твердой насадкой, широкое употребление находят и традиционные варианты, включая простейшую барботажную камеру или аппарат с обычной механической мешалкой и барботером.

В любой биотехнологической разработке, доводимой до этапа инженерного исполнения, неизбежно возникают вопросы: «Можно ли реализовать процесс в биореакторе определенного типа? Какими должны быть детали его конструкции? Каков его предполагаемый объем?» До сих пор биотехнолог не имеет в своем распоряжении стандартных инструкций, годных для любого биотехнологического процесса, хотя существует большое количество

эмпирических наблюдений. Известно, например, что соплоконусные биореакторы обеспечивают эффективный синтез аминокислот бактериями (М. Ж. Кристапсонс, 1984), эрлифтные аппараты успешно используются для получения бактериального белка на базе метанола (В. А. Быков и др., 1985) или этанола (B. Sikyta, 1984в).

Общие теоретические положения о соответствии между типами процессов и аппаратов находятся в стадии разработки. И. Адлер и др. (I. Adler et al., 1985) сравнивают характеристики питательных сред и технологико-экономические параметры процессов в реакторах различных типов на основе трехмерной диаграммы:



Авторы детально исследовали взаимосвязь между потребляемой мощностью аэрирующего устройства и эффективностью аэрации в биореакторах различных типов. Для не слишком высоких [до $4 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$] скоростей массопередачи между газом и жидкостью наибольшую экономию мощности дает аппарат с механическим перемешиванием. Если необходимы большие скорости массопередачи, наиболее экономичен циркуляционный реактор. Естественно, что выбор конкретного типа и варианта биореактора должен производиться не только в зависимости от экономичности системы аэрации, но и по всему массиву различных параметров. Это является одним из стимулов, побуждающих технологично к экспериментальному исследованию биореакторов.

В настоящее время разрабатываются новые способы аэрации. Воздух подается через специальные полипропиленовые мембраны. Такой способ позволяет избежать пенообразования и выдержал испытание в биореакторах для культивирования клеток эукариот, в частности при промышленном получении β -интерферона.

Эффективность аэрации может быть повышена с помощью переносчиков кислорода, добавленных в среду для выращивания клеток. Существуют различные механизмы действия таких пере-

носчиков: а) переносчик принимает кислород при контакте с газовой фазой и отдает его в жидкую фазу; б) переносчик принимает кислород в жидкой фазе и отдает его при контакте с клеткой; в) переносчик принимает кислород из газовой фазы и отдает его непосредственно клетке.

§ 4. Системы теплообмена, пеногашения и стерилизации биореакторов

Рассмотрим системы, общие и в равной степени необходимые для биореакторов всех типов.

Система теплообмена. Теплообмен достигается с помощью труб с охлаждающим или нагревающим агентом, оплетающих корпус аппарата (в целом образующие рубашку биореактора) или пропущенных непосредственно через его полость. Внутренние трубы часто скручивают в виде змеевиков. Такие змеевики широко применяются, поскольку, непосредственно контактируя с культуральной жидкостью, они обеспечивают более эффективный теплообмен, чем внешняя рубашка.

При этом стараются в максимальной степени уменьшить помехи для перемешивания и аэрации, поэтому используют внутренние трубы, размещенные в отражательных перегородках, или пучки труб, проходящие через определенный участок внешней циркуляционной трубы реактора. Не получил большого распространения метод пленочного стекания охлаждающего или нагревающего агента по простенку между корпусом аппарата и специальным внешним легким кожухом.

При конструировании системы теплообмена в согласии с уравнением (1) на с. 55 необходимо стремиться к увеличению как площади ее поверхности, так и общего коэффициента теплопередачи. Для повышения разности температур ΔT в качестве охлаждающего агента применяют, например, воду с низкой температурой (артезианскую или пропущенную через холодильную установку). Для более глубокого охлаждения используют этиленгликоль, фреоны. Нагревающим агентом служит горячая вода или пар.

Система пеногашения. Пеногашение — средство борьбы с избыточным пенообразованием. Различают химические, механические, акустические и некоторые другие виды пеногасителей. Широко применяются два первых типа пеногасителей, нередко их комбинации.

Химические пеногасители представляют собой поверхностно-активные вещества, которые, внедряясь в стенки пузырей воздуха, становятся центрами их неустойчивости. Пеногасящие вещества различаются по своей эффективности, которую можно оценивать по уменьшению слоя пены при заданной концентрации пеногасителя. Остатки пенного слоя устраняются с большим трудом и требуют большого расхода пеногасителя. Это экономически невыгодно, тем более что до известного предела пенообразование

стимулирует рост культур. На практике пену удаляют лишь частично, до определенного приемлемого уровня (К. Г. Федосеев, 1977).

Эффективными химическими пеногасителями служат растительные (соевое, рапсовое, кокосовое, подсолнечное, горчичное масла), животные (сало, рыбий жир) и минеральные жиры. Коварство этих пеногасителей состоит в том, что продукты их утилизации микробной культурой сами способствуют пенообразованию. Преимущество жиров — в совмещении ими двух функций: они гасят пену и одновременно служат ценными субстратами (см. гл. 2, § 1). Среди широкоиспользуемых синтетических пеногасителей — силиконовые масла, полимерные многоатомные спирты и полиэферы (например, японский препарат адеканоль, отечественный пропинол Б-400).

Механические пеногасители включают различные устройства сбивающие пену: лопасти, диски, барабаны, расположенные в верхней части биореактора. К более сложным приспособлениям относятся сепараторы пены, используемые также при сборе биомассы, содержащейся в пенном слое. Применение таких устройств означает дополнительные энергозатраты. Именно в интересах их минимизации часто прибегают к совместному использованию механических и химических пеногасителей.

Система стерилизации. Конструкция и механизм действия системы стерилизации зависят от метода стерилизации биореактора, вспомогательного оборудования, питательных сред и воздуха. Основные методы стерилизации приведены в табл. 2.

Наибольшее значение имеют термический метод для стерилизации оборудования и сред и фильтрационный — для удаления микроорганизмов из вводимого в биореактор воздуха или другого газа. Как правило, для стерилизации сред и аппаратуры используют влажную термическую обработку с применением воды и пара. Такая обработка дает больший эффект, чем нагревание сухого биореактора. Чаще всего используют стерилизацию перегретым паром, вводимым под давлением непосредственно в аппарат или генерируемым в самом биореакторе. Однако в последнем случае среда, содержащая белки, пригорает к электронагревателю, размещенному в аппарате, поэтому реактор стерилизуют с нагретой дистиллированной водой, а среду стерилизуют отдельно.

Эффективность и быстрота уничтожения микрофлоры возрастают по мере повышения температуры: имеет место температурная зависимость, аналогичная уравнению Аррениуса для химических реакций. Высокая температура нагревающего агента (пара, витков спирали электронагревателя) обеспечивает быструю гибель термоустойчивых бактериальных спор, которые часто попадают в «островки теплоизоляции» — глыбки твердых субстратов, густые суспензии высокомолекулярных соединений и т. д.

В то же время по мере повышения температуры ощутимо возрастают энергозатраты на стерилизацию, усиливается отрица-

Таблица 2. Методы стерилизации оборудования, питательных сред и воздуха (по К. Г. Федосееву, 1977; R. S. Conway, 1984; T. Leahy et al., 1984; B. Sikyta, 1984; S. Prentis, 1984)

Метод	Краткая характеристика	Область применения
Термический:	Нагревание объекта стерилизации на время, достаточное для гибели всей микробной популяции	Основной метод стерилизации биореакторов, питательных сред и добавок, вспомогательного оборудования и фильтров для стерилизации воздуха
острым паром	Пропускание струи пара под высоким давлением в аппарат с питательной средой с помощью барботера или парового инжектора	Стерилизация аппаратов и сред
глухим паром	Пар изолирован от стерилизуемых сред металлическими стенками (например, пар пропускают по змеевику)	Стерилизация некоторых питательных сред или их компонентов (например, масел)
паром, генерируемым в самом сосуде, подлежащем стерилизации	Используют электронагреватели, вводимые в стерилизуемый объем	Стерилизация биореакторов и сред, если последние не пригорают к нагревателю
в автоклаве	Стерилизуемые материалы вносят в автоклав — аппарат, где вода доводится до кипения при повышенном давлении	Стерилизация некоторых лабораторных биореакторов, небольших объемов жидкости, мелких элементов вспомогательного оборудования
Химический	Применяют химические дезинфицирующие агенты (β -пропиолактон, окись этилена, окись пропилена), самопроизвольно разлагающиеся в воде без образования токсических продуктов	Стерилизация питательных сред, в основном для лабораторных биореакторов
Фильтрационный	Пропускание газов/жидкостей через мелкопористые или волокнистые фильтры, задерживающие микроорганизмы	Стерилизация поступающего в биореактор воздуха/газа, в меньшей степени используют как мягкий метод стерилизации жидких сред без взвесей
Раднационный	Обработка ультрафиолетовым и радиоактивным излучениями	Не получил распространения

тельное влияние нагревания на качество сред. Следовательно, необходимо найти оптимальную температуру, при которой достигается высокая надежность стерилизации и в то же время сводятся до минимума энергозатраты и порча стерилизуемого материала. Применение пара, подаваемого через змеевики без прямого контакта со средой, ограничивает эффективность стерилизации. Этот метод используется при стерилизации неводных сред, например масляных.

Нагревание вызывает химические превращения компонентов питательных сред. При 100°C и выше карбонильные группы сахаров вступают во взаимодействие с ионами аммония или с аминогруппами аминокислот и белков. При этом образуются неусваиваемые клетками продукты. Этот пример говорит о необходимости в некоторых случаях отдельной стерилизации компонентов питательной среды.

Разложение ряда веществ, например витаминов, вынуждает ограничить время и температуру для термической стерилизации соответствующих сред, а иногда — вовсе отказаться от нее, поэтому применяют химические дезинфицирующие средства или фильтрацию жидкостей (табл. 2). Фильтры, однако, быстро забиваются клетками микроорганизмов и другими взвешенными частицами, чем обусловлено неудобство фильтрационного метода стерилизации жидких сред.

Иногда химические изменения субстратов в процессе термической стерилизации положительно влияют на качество сред. При стерилизации раствора, содержащего глюкозу, аминокислоты и фосфаты, путем фильтрации или путем отдельной термической обработки растворов перечисленных компонентов получается среда, малоподходящая для роста пропионовых бактерий. Напротив, совместная стерилизация аминокислот, фосфатов и глюкозы путем нагревания способствует росту этих бактерий.

Фильтрация воздуха или другого газа обычно обходится без частой смены фильтров, поскольку в них содержание взвешенных частиц меньше, чем в жидких средах. Из фильтров различных типов наиболее перспективны мембранные фильтры из тефлона с диаметром пор около 0,2 мкм. Такие фильтры эффективно задерживают частицы с размерами, в 100 раз меньшими указанного диаметра пор. Это связано в основном с броуновским движением частиц в воздухе, отклоняющим их от прямолинейной траектории, что обуславливает высокую вероятность столкновения частиц со стенками пор и их адсорбцию. Вследствие этого фильтрация приводит к освобождению воздуха не только от бактерий и их спор, но и от бактериофагов и других вирусов (R. S. Conway, 1984; T. Leahy, R. Gabler, 1984). На второй план отступает применение фильтров других видов, сложенных из гранул активированного угля или волокон стеклянной ваты, вискозы, целлюлозы.

Таким образом, важными составными частями современных биореакторов служат системы теплообмена, пеногашения и стерилизации. Работа этих систем может осуществляться успешно лишь при учете всего комплекса противоречивых факторов, влияющих на их эффективность и экономичность. Системы должны работать в наиболее оптимальной области соответствующих параметров (например, концентрация химического пеногасителя или температура стерилизации). Один из путей к оптимизации режимов их функционирования основан на отработке этих режимов непосредственно в промышленных аппаратах, а в биореакторах уменьшенного масштаба — лабораторных и пилотных.

§ 5. Лабораторные, пилотные и промышленные биореакторы: проблемы масштабирования

Технология производственного процесса отрабатывается поэтапно: в лабораторных, пилотных (опытно-промышленных) и промышленных установках. Чаще встречаются (хотя это не является правилом) следующие объемы аппаратов: 0,5—100 л для лабораторных, 100 л — 5 м³ для пилотных и 5—1000 м³ и более для промышленных биореакторов. На каждом из этапов наращивания масштаба биотехнологического процесса — масштабного перехода, масштабирования процесса — решаются свои задачи налаживания производства и его оптимизации.

Лабораторные аппараты напоминают промышленные по форме и устройству систем аэрации и перемешивания. Они подразделяются на те же типы, что и промышленные биореакторы. Правда, наиболее часто в лабораторных масштабах используют аппараты с механическим перемешиванием и барботажем. Тип лабораторного биореактора не обязательно соответствует типу проектируемого промышленного аппарата для того же процесса. Для успеха масштабирования важно не сохранение принципа конструкции, а соответствие важнейших характеристик процесса.

По принципу теплообмена и стерилизации лабораторные аппараты делятся на две категории. К первой относятся аппараты, лишенные собственных систем теплообмена и стерилизации. Подобные «несамостоятельные» биореакторы помещают в водяные бани с постоянной температурой, их стерилизацию проводят в автоклаве. Аппараты другой категории снабжены системами теплообмена и стерилизации, устройство которых в принципе такое же, как в промышленных аппаратах.

Относительно низкие расходы на установку и эксплуатацию позволяют широко применять лабораторные биореакторы для решения следующих задач: 1) кинетических — измеряют скорость роста клеток, утилизации субстратов и образования целевого продукта; 2) некоторых массообменных — рассчитывают коэффициенты массопередачи, скорость поступления в среду O₂ и других газов, скорость освобождения среды от газообразных продуктов жизнедеятельности, в первую очередь CO₂; 3) стехиометрических — устанавливают коэффициенты в брутто-уравнениях химических реакций, связывающих потребленные субстраты и O₂ с получаемыми целевыми и побочными продуктами.

Опытно-промышленные биореакторы обозначают также как пилотные, что подчеркивает характер разработки — пионерский, поисковый, «указывающий путь». На этом этапе масштабирования в общих чертах возможно дублировать конструкционные детали промышленного аппарата и исследовать макрокинетику процесса — динамику потоков жидкости, газа, теплоты. На этапе пилотного биореактора выбирают тип аппарата, который далее применяют в промышленном масштабе. Реализация биотехнологического процесса в промышленных масштабах требует значи-

тельных капиталовложений и текущих затрат; к работе необходимо привлечь обслуживающий персонал, поэтому предварительно следует убедиться, что процесс «пойдет» не только в лабораторных аппаратах, но и после масштабного перехода к большим установкам. Масштабная модель создается путем перехода от лабораторных биореакторов к пилотным.

Чтобы облегчить конструирование пилотных биореакторов и апробировать их различные варианты, создают специальные наборы стандартных унифицированных деталей, которые можно соединять и компоновать в различных сочетаниях. Переход к унификации деталей пилотных и промышленных биореакторов — важная тенденция современной биотехнологии (P. J. Bagger, 1983).

На этапе промышленного реактора производят синтез кинетических и стехиометрических характеристик, полученных на лабораторном аппарате, с гидродинамическими, массо- и теплообменными закономерностями процесса, выявленными на пилотном биореакторе. При масштабировании параметры процесса не могут сохраниться в неизменном виде. Наиболее существенно то, что при одной и той же среде культивирования и конструкции аппарата, при совпадающих температурах, pH и скорости перемешивания уровень и скорость синтеза целевого продукта могут существенно различаться — факт, замеченный еще в 1940—1950 гг. при организации крупномасштабного производства антибиотиков.

В лабораторных биореакторах, особенно в так называемых «мини»-аппаратах (менее 1 л), процесс может протекать вообще без перемешивания. По мере увеличения объема биореактора даже при интенсивном перемешивании в аппарате появляются зоны неоднородности, недостаточной аэрации, массообменные характеристики различаются по зонам реактора. Промышленный биореактор можно уподобить лабораторной установке, состоящей из двух сообщающихся реакторов малого объема, из которых перемешивается и аэрируется только один, а другой соответствует зоне слабого перемешивания и аэрации (N. M. G. Oosterhuis et al., 1985). Важно подчеркнуть, что если изготовить точную миникопию промышленной конструкции, то такой лабораторный реактор будет характеризоваться высокой однородностью среды и аэрации. Этот пример показывает, что для сохранения параметров процесса при изменении объема аппарата нередко требуется менять его конструкцию, жертвовать второстепенными характеристиками ради сохранения главных.

Лабораторные, пилотные и промышленные биореакторы различаются по условиям теплообмена. В лабораторных аппаратах одним из основных «генераторов теплоты» служит механическая мешалка (если она используется), вклад метаболических процессов в разогрев среды незначителен. При разности температур между средой и охлаждающим агентом около 5° для эффективного теплообмена достаточно теплообменной рубашки по всей высоте реактора. Можно также поместить его в водяную баню.

В пилотном биореакторе соотношение между поверхностью и объемом аппарата снижается, что затрудняет теплообмен через стенки аппарата. При переходе к промышленному реактору это соотношение уменьшается еще более, так что внешней теплообменной рубашки часто оказывается недостаточно для эффективного отвода теплоты, приходится вводить внутренние теплообменные элементы. По мере увеличения объема аппарата резко возрастает теплопродукция в ходе диспергирования газа в жидкости (так называемая пневматическая энергия). Это объясняется увеличением толщины слоя жидкости, через который проходят пузыри газа на пути от аэратора к поверхности среды культивирования (В. В. Бирюков, Л. М. Кузьмина, 1984).

Из всего сказанного ясно, что при переходе от лабораторного биореактора к пилотному и далее к промышленному необходимо наряду с объемом менять конструкцию и режим работы аппарата. Сложная и дискуссионная проблема — какие характеристики процесса, непосредственно определяющие его успех, необходимо сохранить? Так, наряду с сложными параметрами, математическое выражение которых включает сочетание ряда характеристик процесса и оборудования (К. Г. Федосеев, 1977; В. В. Бирюков, Л. М. Кузьмина, 1985; В. В. Бирюков, В. М. Кантере, 1985), рекомендуют сохранить неизменным объемный коэффициент массопередачи O_2 . Однако этот коэффициент — ненадежный критерий успеха масштабирования, например, для процесса получения пенициллина (В. В. Бирюков, Л. М. Кузьмина, 1984). Не менее сложным является выбор критериев оценки гидродинамического режима, теплообмена, пеногашения. Отметим, что при масштабировании возрастает и становится серьезной проблемой брызгоунос — унос потоком прошедшего через аппарат газа капель среды, образующихся при разрушении пенных пузырей пеногасителями.

Основными этапами масштабного перехода служат, таким образом, лабораторные, пилотные и промышленные аппараты. Центральной проблемой здесь является выбор надежных критериев масштабирования с целью высокоэффективного и экономического биосинтеза целевого продукта в промышленных условиях.

§ 6. Биотехнологические процессы и аппараты периодического и непрерывного действия

Биотехнологические процессы могут быть основаны на периодическом или непрерывном культивировании. Периодический процесс подобен естественному ходу сельскохозяйственных работ, начинающихся весенним засевом полей и заканчивающихся сбором урожая, в то время как непрерывный процесс напоминает рост растений в оранжерее, когда вегетация и плодоношение продолжают неограниченно долго в любое время года.

Периодические процессы. Периодический процесс включает:

- а) стерилизацию сред, биореактора и вспомогательного оборудо-

вания; б) загрузку аппарата питательной средой; в) внесение посевного материала (клеток, спор); г) рост культуры, который может совпадать во времени со следующим этапом или предшествовать ему; д) синтез целевого продукта; е) отделение и очистку готового продукта. Речь идет о временной последовательности этапов, по окончании последнего этапа проводится мойка биореактора и его подготовка к новому циклу.

В свою очередь этап роста культуры включает: а) лаг-фазу — сравнительно медленный рост внесенной культуры, осваивающей новую среду обитания в объеме биореактора; б) экспоненциальную фазу — бурное деление клеток, сбалансированный рост культуры; в) фазу замедления роста, связанного с исчерпанием питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма; г) стационарную фазу — прирост клеток равен их убыли; д) фазу отмирания — постепенное снижение числа жизнеспособных клеток.

В течение экспоненциальной фазы прирост биомассы в единицу времени dC/dt пропорционален концентрации клеток C :

$$\frac{dC}{dt} = \mu C, \quad (2)$$

где коэффициент пропорциональности μ соответствует удельной скорости роста. Это уравнение, записанное в интегральной форме, раскрывает смысл обозначения «экспоненциальная фаза роста»:

$$\ln C - \ln C_0 = \mu(t - t_0). \quad (3)$$

Разность между логарифмами концентраций клеток (C и C_0) в два различных момента времени (t и t_0) пропорциональна прошедшему интервалу времени.

Биотехнологически ценные продукты синтезируются в экспоненциальную фазу (нуклеотиды, многие ферменты, витамины — так называемые первичные метаболиты) или в стационарную фазу роста (антибиотики, красящие вещества и т. д. — так называемые вторичные метаболиты или идиолиты). Классическим примером переключения культуры с синтеза одного продукта на синтез другого служит ацетонобутиловое брожение, впервые изученное В. Н. Шапошниковым. Продуцент, анаэробная бактерия *Clostridium acetobutylicum*, образует вначале органические кислоты, главным образом масляную. Это ведет к постепенному снижению рН среды культивирования. Когда рН достигает порогового значения, клетки бактерии переключаются на синтез нейтральных продуктов — ацетона и бутанола. Аналогичная двухфазность в образовании продуктов характерна для многих других организмов.

Современные периодические процессы основаны на принципе дифференцированных режимов культивирования (см. гл. 2, § 2), который отвечает смене фаз роста культуры. Например, при культивировании актиномицета *Streptomyces nigrificans* — сверх-

продуцента фермента ксилозоизомеразы — проводят ступенчатое изменение режима аэрации и перемешивания после 12 ч роста (К. Демпегова et al., 1984).

Широко применяют *периодическое культивирование с подпиткой*: помимо внесения питательного субстрата в реактор до введения в него биообъекта, в процессе культивирования в аппарат добавляют питательные вещества через определенные промежутки времени порциями или непрерывно «по каплям». Иногда дополнительно вносят биообъект. В рассмотренном примере со *Str. nigrificans* субстрат (сахара) добавляют к среде культивирования дважды — исходно и в середине процесса.

Существует также *отъемно-доливочное культивирование*, когда часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды. Это приводит к регулярному омолаживанию культуры и к задержке ее перехода к фазе отмирания. Такой режим культивирования в значительной мере уподобляется непрерывному процессу и поэтому называется также *полунепрерывным культивированием*.

Модификацией периодического культивирования является также *культивирование с диализом*, при котором субстрат постоянно поступает в культуральную жидкость через специальную мембрану. Диализ ведет к уменьшению концентрации продуктов жизнедеятельности, подавляющих рост биообъекта. Стимуляция роста тиобацилл может быть достигнута путем постоянного удаления методом диализа накапливаемого в среде ингибитора их метаболизма (С. Дж. Перт, 1978). Кроме того, путем диализа из культуры удаляют часть жидкости, что позволяет получить в конце процесса концентрированный урожай биомассы.

Непрерывные процессы. В непрерывных процессах биообъект постоянно поддерживается в экспоненциальной фазе роста. Обеспечивается непрерывный приток свежей питательной среды в биореактор и отток из него культуральной жидкости, содержащей клетки и продукты их жизнедеятельности. Фундаментальным принципом непрерывных процессов служит равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью в результате разбавления свежей средой:

$$\mu = D, \quad (4)$$

где μ — удельная скорость роста клеток, как и в уравнениях (2) и (3); D — коэффициент разбавления (скорость убыли концентрации клеток). Различают хемостатный и турбидостатный режимы непрерывного культивирования.

При *хемостатном* режиме культивирования в биореактор с постоянной контролируемой скоростью вливают питательную среду, один из компонентов которой, часто O_2 , поступает в количестве, не достаточном для обеспечения максимальной скорости роста культуры. В этом случае реактор с биообъектом приобретает свойства саморегулирующейся системы, автоматически удовлетворяющей равенству (4). Если первоначально скорость разбав-

ления и вымывания биомассы превышает скорость роста клеток, то наступает разбавление культуры свежей средой. Это ведет к повышению концентрации компонента, ограничивающего рост, вследствие чего скорость роста культуры увеличивается. Как только μ превысит D , в реакторе начинает концентрироваться биомасса. Увеличивающаяся популяция клеток все активнее «выедает» субстрат, его концентрация падает, что, в свою очередь, ведет к торможению роста культуры. Таким образом, после серии затухающих колебаний скорость роста культуры становится равной скорости ее разбавления.

Биореактор, работающий в хеостатном режиме культивирования, называют *хеостатом*. Он включает: 1) устройство для вливания питательной среды; 2) выпускное приспособление для оттока культуральной жидкости с клетками; 3) систему контроля скорости потока.

Один из простейших вариантов хеостата содержит насос, постоянно нагнетающий питательную среду в биореактор, и выпускную трубу, по которой жидкость из биореактора вытекает, как только ее уровень поднимается выше горловины этой трубы. Альтернативный вариант — выпускная труба входит в полость биореактора сверху и нижний обрез ее горловины соответствует уровню, выше которого жидкость не должна подниматься. Если этот уровень превышен, избыток культуральной среды с клетками отсасывается насосом, подсоединенным к выпускной трубе.

Более точный и в то же время дорогостоящий метод основан на взвешивании биореактора, помещенного на специальную платформу: превышение допустимой массы свидетельствует о подъеме жидкости выше разрешенного уровня и приводит к автоматическому включению системы откачивания жидкости (Lab. Pract., 1985). Использовали также радиоактивный контроль уровня жидкости: изотоп, помещенный на определенной высоте над дном аппарата, испускает радиоактивное излучение, которое в разной степени поглощается водной и воздушной средой. По интенсивности излучения, регистрируемого приемником, судят о высоте подъема жидкости (К. Г. Федосеев, 1977). В последние годы все большее применение находят фотоэлектронные устройства для контроля уровня жидкости в хеостате.

Турбидостатный режим культивирования основан на прямом контроле концентрации биомассы. Наиболее распространено измерение светорассеяния содержимого биореактора с помощью фотоэлемента. Сигнал от фотоэлемента управляет скоростью потока жидкости, в свою очередь определяющего скорость роста культуры. Повышение концентрации клеток и соответственно светорассеяния автоматически приводят к ускорению потока жидкости, разбавляющей культуру, и, наоборот, убыль биомассы компенсируется замедлением потока.

Концентрация клеток может оцениваться также по косвенным критериям (по измерению pH, убыли субстрата или накоплению продуктов жизнедеятельности). По своей конструкции

турбидостат отличается от хемостата лишь системой контроля скорости протока.

Хемостаты и турбидостаты эффективно действуют при различных скоростях разбавления культуры. Хемостатный режим успешно применяются при малом протоке, когда концентрация клеток меняется незначительно с изменением его скорости, что облегчает саморегулировку системы. Область функционирования турбидостата — высокие скорости разбавления, при этом происходит быстрое и резкое изменение концентрации биомассы в ответ на смену скорости протока. Это обеспечивает своевременное срабатывание фотозлемента или другого датчика, управляющего скоростью протока жидкости через турбидостат. С технической точки зрения турбидостат может быть применен лишь для одноклеточных организмов (С. Дж. Перт, 1977). При длительном культивировании биообъекта в турбидостате возникает серьезная проблема, связанная с прилипанием клеток к фотоз элементу.

При засеве смешанной культуры в турбидостате автоматически отбирается наиболее быстрорастущий вид. Это является преимуществом турбидостатного метода, в определенной степени предохраняющим культуру микроорганизма от заражения посторонней микрофлорой. Такой принцип использован для селекции антибиотикоустойчивых организмов (С. Дж. Перт, 1978).

Непрерывное культивирование, осуществляемое в одном биореакторе, обозначается как одностадийное. Многостадийное культивирование с последовательным или каскадным расположением реакторов позволяет внедрить принцип дифференцированных режимов в непрерывные биотехнологические процессы. Эти дифференцированные режимы не сменяют друг друга во времени, а одновременно осуществляются в последовательно расположенных аппаратах. Например, в первом из биореакторов создают оптимальные условия для роста культуры, а во втором — для биосинтеза целевого продукта.

В простейшем случае свежая среда подается в первый из расположенных в ряд аппаратов. В более сложных биореакторных системах среду или ее отдельные компоненты вводят и на последующих стадиях процесса, осуществляемых в остальных биореакторах. Эта система, являющаяся аналогом периодического культивирования с подпиткой, может быть дополнена механизмом рециркуляции отдельных порций биомассы, возвращаемых с более «поздних» стадий к более «ранним». Здесь «ранний» и «поздний» в отличие от периодического культивирования соответствуют не временным, а пространственно разделенным этапам процесса. Подпитка позволяет значительно повысить конечный выход биомассы (С. Дж. Перт, 1978).

При разработке новых биотехнологических процессов первоначально прибегают к периодическому культивированию. На непрерывный режим пока переведена сравнительно небольшая доля биотехнологических процессов. Перспективность непрерывных процессов связана с возможностью конвейерного получения

больших количеств целевого продукта, для которых в условиях периодического культивирования потребовались бы крупногабаритные аппараты. Переход к непрерывным процессам сокращает затраты рабочего времени на загрузку и разгрузку биореактора, его чистку и мойку.

В то же время непрерывные процессы, особенно многостадийные, в сравнении с периодическими требуют более сложной конструкции аппарата и систем контроля, что ведет к увеличению капиталовложений. Надежность аппаратов для непрерывных биотехнологических процессов тоже должна удовлетворять более высоким требованиям. Достаточно сказать, что в многостадийных процессах, наиболее перспективных из непрерывных, нарушение режима работы одного из аппаратов влечет за собой выход из строя всей установки. Непрерывные процессы в сравнении с периодическими обычно дают более высокий выход продукта в единицу времени (в расчете на один и тот же объем), однако концентрация продукта всегда бывает ниже, что обуславливает меньшую окупаемость средств, затраченных на непрерывный процесс (К. Г. Федосеев, 1977). Длительное протекание непрерывных биотехнологических процессов ведет к обрастанию труб и стенок биореакторов, особенно при культивировании мицелиальных грибов и актиномицетов, так что необходимо изобретать особые средства борьбы с этим явлением. При непрерывном культивировании мутантных и особенно генноинженерных штаммов продуцентов возникает угроза утраты их ценных свойств. Поэтому актуальной является разработка методов длительного поддержания подобных полезных «монстров» в активном состоянии.

Периодическое культивирование еще далеко не исчерпало своих возможностей. Его модификации (с подпиткой, отъемно-доливочное) дают очень высокие выходы целевых продуктов, порой намного превышающие результаты применения чисто непрерывных процессов (Lab. Pract., 1985). Эти модификации дают простор для компьютерной оптимизации на основе: 1) принципа дифференцированных режимов и 2) принципа программного управления процессом. Программируются все нюансы аэрации, температурных условий, значений pH и окислительно-восстановительного потенциала среды в течение всего биотехнологического процесса. В целом решение вопроса о выборе периодического или непрерывного режима того или иного процесса должно быть подчинено соображениям экономической целесообразности.

§ 7. Специализированные типы биотехнологических процессов и аппаратов

Анаэробные процессы. Реакторы для анаэробных процессов не имеют приспособлений для аэрирования среды. Однако некоторые из этих процессов протекают с потреблением газообразных субстратов — водорода, метана, поэтому приходится применять барботер и другие приспособления для подачи газа в жид-

кость. Например, установка для бактериальной денитрификации воды (ее очистки от нитратов и нитритов), функционирующая в анаэробных условиях, включает приспособление для обеспечения водородом. Перемешивание среды в ходе анаэробных процессов осуществляется низкоскоростной механической мешалкой или созданием тока жидкости по циркуляционному контуру. В зависимости от того, насколько строго следует придерживаться анаэробных условий, применяют конструкционные детали, предохраняющие среду культивирования от контакта с кислородом (Lab. Pract., 1985).

Упрощение конструкции аппаратов при ведении процессов в анаэробных условиях, естественно, ведет к их удешевлению — фактор, побуждающий отказываться от аэробных процессов в пользу анаэробных, в частности, при очистке сточных вод (J. van Kasteren, 1983). В то время как аэробное расщепление органических субстратов ведет к их полному «сжиганию» до CO_2 и H_2O , в анаэробных условиях микроорганизмы образуют ценные низкомолекулярные продукты — спирты, ацетон, органические кислоты. Внимание биотехнологов к анаэробным процессам повышается в связи с дефицитом нефти и природного газа.

Твердофазные и газофазные процессы. Многие биотехнологические процессы основаны на взаимодействии трех фаз — твердой, жидкой и газообразной. Имеются процессы, в которых роль жидкой фазы сведена до минимума: она лишь увлажняет твердую поверхность и (или) воздух (газ). В зависимости от преобладающей фазы такие процессы и соответствующие им аппараты обозначают как твердофазные или газофазные.

Твердофазные процессы, осуществляемые, как правило, на базе растительного сырья, проводят с использованием различных организмов, но чаще всего речь идет о мицелиальных грибах и дрожжах, нередко их комбинациях в условиях смешанного или последовательного культивирования. Различают три типа твердофазных процессов.

1. Поверхностные процессы. Слой субстрата, например соломы, не превышает 3—7 см («тонкий слой»). Роль биореакторов выполняют большие, площадью до нескольких квадратных метров, подносы из алюминия или культивационные камеры (рис. 9).

2. Глубинные твердофазные процессы в перемешиваемом слое («высокий слой»). Биореакторы представляют собой глубокие открытые сосуды. Для аэробных твердофазных процессов такого типа разработаны приспособления, обеспечивающие диффузионный и конвективный газообмен (Е. Л. Головлев и др., 1985).

3. Твердофазные процессы в перемешиваемой и аэрируемой массе субстрата, которая может быть гомогенной (полужидкий навоз) или состоять из частиц твердого субстрата, взвешенных в жидкости (переходный вариант между твердофазным процессом и процессом в жидкой фазе). Обычно используют

биореакторы с низкоскоростными мешалками. Перемешивание при обилии твердой фазы травмирует биообъект, что особенно ощутимо для мицелиальных грибов (Е. Л. Головлев, 1985). Мягкое перемешивание достигается при использовании шнековых (винтовых) мешалок или если биореактор представляет собой вращающийся барабан. Примером этого варианта служит микробиологическое выщелачивание сернистых соединений из каменного угля, который суспендируют в минеральной среде в виде гранул (F. Kargi, J. M. Robinson, 1985).

Интерес к твердофазным процессам объясняется их преимуществами в сравнении с процессами, протекающими в жидкой среде: 1) они требуют меньших затрат на оборудование и эксплуатацию; 2) характер субстрата облегчает отделение и очистку продукта; 3) низкое содержание воды в субстрате препятствует заражению культуры продуцента посторонней микрофлорой; 4) в отличие от процессов в жидкой фазе твердофазные процессы не связаны со сбросом в окружающую среду большого количества сточных вод — потенциального источника ее загрязнения (F. Kargi et al., 1985).

Твердофазное культивирование вызывает и определенные проблемы. В большинстве твердофазных процессов отсутствует перемешивание, рост микроорганизмов происходит по принципу колонизации: по мере размножения они распространяются из точек внесения в субстрат по всему его объему. При этом отдельные зоны в толще субстрата избыточно заселяются клетками и возникает локальная нехватка питательных ресурсов, в то время как значительная часть субстрата остается незатронутой. Преодоление этой проблемы связывают с внесением возможно большего количества посевного материала, распределяемого по всему объему субстрата. Рекомендуется периодическое культивирование с многократным отъемом части субстрата с биомассой и внесением эквивалентного количества перемешиваемого свежего субстрата — аналог отъемно-доливочного культивирования. Такой полунепрерывный режим предотвращает истощение питательных веществ в зонах роста биообъекта по толще субстрата,

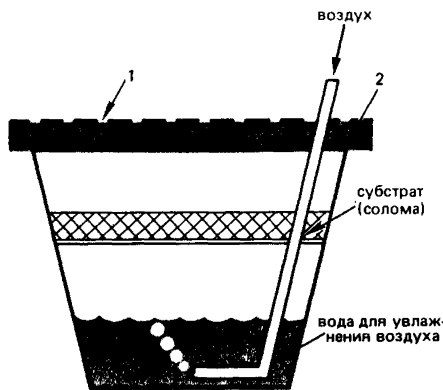


Рис. 9. Биореактор (культивационная камера) для твердофазного поверхностного культивирования (по А. Л. Abdullah et al., 1984): субстрат (солома) опирается на металлическую сетку (не обозначено); отработанный газ покидает аппарат через поры в крышке (1); стеклянная вата (2) образует фильтр, предохраняющий биореактор от попадания посторонней микрофлоры

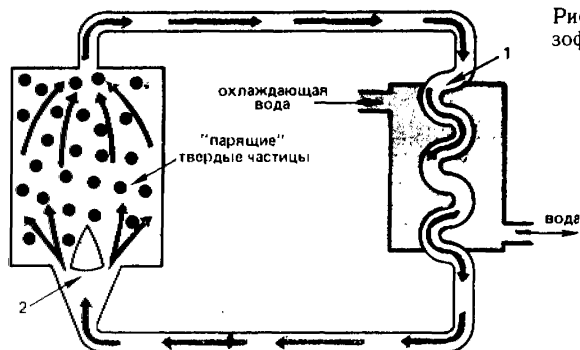


Рис. 10. Биореактор для газофазного культивирования (по О. Моебус, М. Теубер, 1984). Поток газа ускоряется расположенным в циркуляционном контуре насосом. На рисунке не показаны приспособления для подачи газа и сбора жидких летучих продуктов, осевших на стенках холодильника: 1 — змеевик; 2 — сопло для подачи газа-носителя

так как на место использованного регулярно поступает свежий субстрат. Колонизация субстрата облегчается при его предварительной обработке, например, предгидролизом.

До конца не разрешенной проблемой является контроль за эффективностью аэрации различных участков субстрата, температурой и уровнем влажности. Это связано с неоднородностью условий в толще твердого субстрата вследствие затруднений с его перемешиванием. Разрабатывают малотравматичные режимы механического перемешивания и другие методы усиления массопередачи и теплообмена (I. J. Laukevics et al., 1985).

Газофазные процессы осуществляют в аппаратах с твердым наполнителем, через который пропускают ток газа (рис. 10). В таких аппаратах получают спирт на основе дрожжей, а также их биомассу (О. Моебус, М. Теубер, 1984). Мелкие агрегаты дрожжевых клеток, предварительно увлажненные концентрированной питательной средой, «парят» внутри биореактора в мощном потоке газа, вырывающегося из сопла в днище аппарата. Газ, покидающий аппарат, несет летучие продукты жизнедеятельности дрожжей, в том числе спирт, конденсируемый в холодильнике.

Процесс может быть реализован как в аэробных (и тогда газ-носитель — воздух), так и в анаэробных условиях (в этом случае через реактор продувают CO_2). Агрегаты дрожжевых клеток играют здесь одновременно роль и биообъекта, и твердого наполнителя. Аналогичную установку использовали для переработки риса и сои в кодзи (традиционный японский продукт питания) с применением плесневых грибов (Т. Акао et al., 1977).

Поверхностные процессы. Поверхностное культивирование биообъектов в жидкой питательной среде вблизи раздела фаз газ — жидкость — распространенный метод, хотя и уступающий по эффективности синтеза целевого продукта глубинному методу культивирования. Однако метод остается в ходу применительно к процессам, сопровождающимся накоплением внеклеточных продуктов в культуральной среде или зависящих от контакта между организмом и воздушной средой. Такой контакт требуется для мицелиальных грибов при переходе к определенным стадиям развития. Экономический выигрыш связан с относительной простотой изготовления и эксплуатации биореакторов.

Завершающая стадия биотехнологического процесса — выделение целевого продукта. Эта стадия существенно различается в зависимости от того, накапливается продукт в клетке или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является сама клеточная масса (рис. 11). Наиболее сложно выделение продукта, накапливающегося в клетках. Для этого клетки необходимо отделить от культуральной жидкости, разрушить (дезинтегрировать) и далее целевой продукт очистить от массы компонентов разрушенных клеток. Выделение продукта облегчается, если он высвобождается (экскретируется) продуцентом в культуральную жидкость. Поэтому понятно стремление биотехнологов получить методами генетической инженерии промышленные штаммы микроорганизмов, экскретирующих возможно большее количество ценных продуктов.

Технология выделения и очистки в значительной степени зависит от природы целевого продукта. Так, ферменты (протеазы, целлюлазы и т. д.) выделяют путем осаждения органическими растворителями или сульфа-

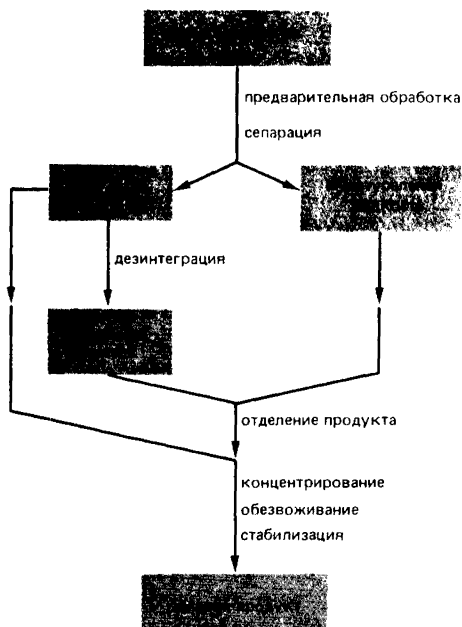


Рис. 11. Основные этапы отделения и очистки биотехнологических продуктов

том аммония. Имеется возможность обойтись без их полной очистки, поскольку в народном хозяйстве широко используют смешанные ферментные препараты, содержащие несколько белков, близких по физико-химическим свойствам. В то же время такие ферменты, как эндо- и экзонуклеазы, лигазы, требуют сложной многостадийной очистки с применением тонких методов препаративного разделения. Некоторые традиционные биотехнологические процессы вообще не включают этапа отделения продукта.

§ 1. Отделение биомассы от культуральной жидкости

Первым этапом на пути к очистке целевого продукта является разделение культуральной жидкости и биомассы — *сепарация*. Иногда сепарации предшествует специальная обработка культуры — изменение pH, нагревание, добавление коагулянтов белков или флокулянтов для более эффективного отделения биомассы и стабилизации продуктов. Существуют различные методы сепарации.

1. Флотация. Метод может быть применен, если клетки продуцента в биореакторе из-за низкой смачиваемости накапливаются в поверхностных слоях жидкости. Флотаторы различных конструкций сцеживают, откачивают или соскребают пену, состоящую из пузырьков газа с прилипшими к ним клетками. Повышение эффективности отбора биомассы в виде концентрированной суспензии достигается вспениванием жидкости с последующим отделением ее верхнего слоя. Флотацию широко используют как первый этап отделения дрожжевой массы для осветления культуральной жидкости. К достоинствам метода относятся экономичность, высокая производительность, возможность применения в условиях непрерывного процесса.

2. Фильтрация. Все применяемые в настоящее время виды фильтров, барабанные, дисковые, ленточные, тарельчатые, карусельные вакуум-фильтры, фильтр-прессы различных конструкций, мембранные фильтры (В. А. Быков и др., 1985; В. Sikyta, 1984 e) используют один и тот же принцип — задержание биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Диаметр пор может превышать размеры клеток, что практически не снижает эффективность фильтрации. Даже если первая небольшая порция биомассы проскакивает через фильтр, в дальнейшем по мере прохождения жидкости диаметр капиллярных каналов сужается из-за прилипания частиц к стенкам, образуются скопления клеток у фильтрующей поверхности, препятствующие прохождению новых порций биомассы через фильтр. По мере утолщения слоя биомассы на фильтре скорость протока жидкости через него падает.

Для фильтров непрерывного действия, рассчитанных на длительное пользование, предусматривают системы автоматического

удаления слоя биомассы, забивающего поры. Биомассу сдувают с поверхности фильтра сжатым воздухом или срезают специальным ножом. Такие способы удаления биомассы характерны, в частности, для барабанного вакуум-фильтра, представляющего собой полый цилиндр, погруженный в культуральную жидкость. Внутренний объем барабана отделен от жидкости фильтрующим мелкопористым материалом. Ток жидкости через фильтрующий слой создается путем откачивания воздуха изнутри барабана вакуумным насосом.

Существуют также фильтры, предназначенные для однократного или многократного периодического использования. Среди них выделяются мембранные (например, тефлоновые) фильтры, позволяющие проводить фильтрацию очень разбавленных клеточных суспензий. Однако проблемой при использовании мембранных фильтров является их закупорка клетками, белками, коллоидными частицами. Приемы срезания или сдувания материала, закупоривающего поры, здесь непригодны, поскольку при этом мембранные фильтры повреждаются. Один из путей преодоления проблемы — покрытие мембран гидрофильным слоем, препятствующим контакту белков (коллоидов) с мембраной (S. Le Minh, Y. P. Billigheimer, 1985).

3. Центрифугирование. Метод основан на осаждении взвешенных в жидкости частиц с применением центробежной силы. Центрифугирование требует более дорогостоящего оборудования, чем фильтрование. Поэтому оно оправдывает себя (B. Sikyta, 1984 e), если: а) суспензия фильтруется медленно; б) поставлена задача максимального освобождения культуральной жидкости от содержащихся частиц; в) необходимо наладить непрерывный процесс сепарации в условиях, когда фильтры рассчитаны только на периодическое действие. Центрифугирование и фильтрация в некоторых производственных процессах реализуются в комбинации — речь идет о фильтрационных центрифугах. Широко применяют центрифуги, где разделение жидкой и твердой фаз не связано с фильтрацией и основано лишь на центробежной силе. Используют центрифуги различных типов, классифицируемые по скорости вращения сосуда (стакана) для разделения биомассы и культуральной жидкости, по способу выгрузки осевшей биомассы и по другим критериям. Наиболее перспективны для осаждения биомассы центрифуги-сепараторы, в которых биомасса оседает на стенках вращаемого цилиндра или на тарелках специальной тарельчатой вставки.

§ 2. Методы разрушения клеток

Разрушение клеток (дезинтеграцию) проводят физическим, химическим и химико-ферментативным методами.

Наибольшее индустриальное значение имеет физическое разрушение: 1) ультразвуком; 2) с помощью вращающихся лопастей или вибраторов — метод, обычно используемый в пилотных и

промышленных установках (В. Sikyta, 1984e); 3) встряхиванием со стеклянными бусами; 4) продавливанием через узкое отверстие под высоким давлением; 5) раздавливанием замороженной клеточной массы; 6) растиранием в ступке; 7) осмотическим шоком; 8) замораживанием — оттаиванием; 9) сжатием клеточной суспензии с последующим резким снижением давления (декомпрессия).

Физические способы разрушения более экономичны, чем химические и химико-ферментативные. Они осуществляются без применения дорогостоящих и дефицитных реактивов и ферментных препаратов. В то же время этим способам дезинтеграции клеток присуща определенная неизбирательность: обработка может отрицательно влиять на качество получаемого продукта. При тонкой регулировке условий дезинтеграции некоторые из физических методов позволяют целенаправленно выделить какую-либо одну фракцию внутриклеточного содержимого.

Осторожное и избирательное разрушение клеточной стенки возможно при использовании химических и химико-ферментативных методов. Так, клетки грамотрицательных бактерий обрабатывают лизоцимом в присутствии этилендиаминтетрауксусной кислоты, а клетки дрожжей — зимолиазой улитки или ферментами грибов, актиномицетов. К разрушению клеточной стенки микроорганизмов ведет обработка клеток толуолом или бутанолом, что находит промышленное применение при получении дрожжевого автолизата и ряда ферментов (инвертаз, пенициллинамидазы). Эффективный лизис клеток вызывают антибиотики полимиксины, тироцидины, новобиоцин, нистатин и другие, некоторые поверхностно-активные вещества, а также глицин. Можно использовать автолиз клеток при лимитированном по определенному субстрату росте или их лизис при заражении бактериофагами. Последний вариант сопряжен с риском неконтролируемого распространения фага в промышленных установках и поэтому не получил применения.

За дезинтеграцией клеток следует этап отделения фрагментов клеточных стенок. Используют те же методы, что и при сепарации клеток: центрифугирование или фильтрацию. Однако, соотносясь с размерами субклеточных частиц, применяют более высокоскоростные центрифуги и фильтры с меньшим диаметром пор (часто мембранные), чем при сепарации клеток. В большинстве биотехнологических процессов клеточные стенки отбрасывают как балласт, но возможно и промышленное получение компонентов клеточных стенок как целевого продукта.

§ 3. Отделение и очистка продуктов

Выделение целевого продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции.

Осаждение растворенных веществ возможно физическими (нагревание, охлаждение, разбавление или концентрирование

раствора) или химическими воздействиями, переводящими отделяемый продукт в малорастворимое состояние. Так, в присутствии соединений калия пенициллин переводят в кристаллический осадок. Белки отделяют добавлением сульфата аммония или органических растворителей (этанола, ацетона). Нуклеиновые кислоты осаждают с помощью полиминов, основные группы которых вступают во взаимодействие с их фосфатными группами. Важной современной модификацией метода является аффинное осаждение (см. ниже).

Экстракцию можно подразделить на твердо-жидкофазную, при которой продукт из твердой фазы переходит в жидкую, и жидко-жидкофазную — перевод продукта из одной жидкой фазы в другую.

К твердо-жидкофазной экстракции относится простое обливание твердого образца водой с целью извлечения из него растворимых веществ, например солей металлов из руд, подвергнутых бактериальной обработке, или растворимых продуктов из массы субстрата (соломы и т. д.) при твердофазном культивировании. Широко применяют органические растворители, в частности экстракцию клеточной массы ацетоном, переводящим в раствор ряд липидных и белковых компонентов.

Жидко-жидкофазная экстракция органическим растворителем часто применяется для извлечения из культуральной жидкости антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов, некоторых гидрофобных белков. Витамин В₁₂ экстрагируют фенолом и его производными (крезол, другие алкилфенолы, галогениды), высокооспецифичным экстрагирующим растворителем служит бензиловый спирт, особенно в щелочных условиях. Такие фосфолипиды, как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин, извлекают путем экстракции хлороформом.

Эффективность экстракции может быть повышена: 1) переходом от однократной обработки экстрагирующим агентом к многократной, когда растворитель, насыщенный экстрагированным продуктом, заменяют свежим растворителем; 2) выбором оптимального растворителя, т. е. повышением коэффициента распределения целевого продукта между водной и органической фазами — этот коэффициент показывает, во сколько раз растворимость продукта в одной из несмешивающихся фаз выше, чем в другой; 3) нагреванием экстрагирующего агента и (или) экстрагируемой жидкости, содержащей продукт; 4) понижением давления в аппарате для экстракции, что позволяет вести эффективную экстракцию при невысокой температуре, избегая связанных с нагреванием затрат и риска инактивации продукта.

Полностью избежать нагревания, губительного для многих ценных веществ, позволяют методы холодной экстракции (криоэкстракции). Она как бы нивелирует различие между твердым субстратом и культуральной жидкостью, поскольку и то и другое находится в замороженном состоянии. Кристоэкстракция осуществляется растворителями, кипящими при низких темпе-

ратурах и находящимися при комнатной температуре в газообразном состоянии.

Для экстракции неполярных органических соединений можно использовать жидкий пропан или бутан (температуры кипения -42 и $-0,5^{\circ}\text{C}$ соответственно). При последующем осторожном нагревании до $\sim 0^{\circ}\text{C}$ кипящий растворитель улетучивается и продукт остается в чистом виде. Органические кислоты, в том числе твердые, малорастворимые в воде, могут быть извлечены из замороженного образца жидким аммиаком (температура кипения $-33,5^{\circ}\text{C}$) в виде солей аммония. Этот процесс служит примером экстракции, сопряженной с химической реакцией.

Криозэкстракция может использоваться в комбинации с криоконсервацией клеток. Урожай клеток длительное время хранится без потери свойств в условиях глубокого замораживания. Затем одна часть его направляется на экстракцию целевого продукта, другая — на инокуляцию биореактора для нового производственного процесса, третья остается в криобанке.

Экстрагирующий агент может находиться не в жидком, а газообразном состоянии (жидко-газофазная или твердо-газо-

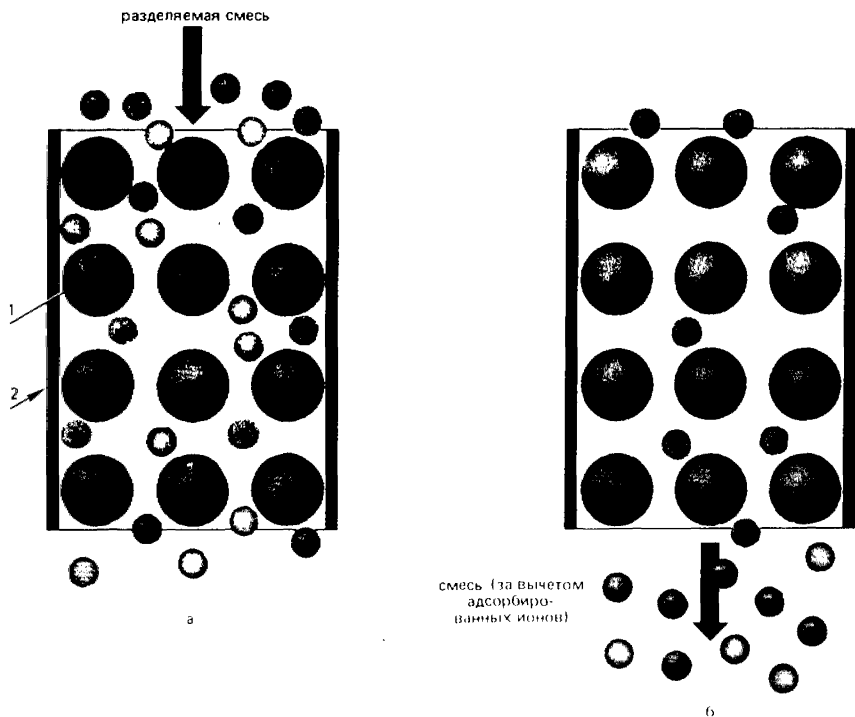


Рис. 12. Катионообменная хроматография (Схематизировано: не показано проникновение катионов в поры частиц геля, изображено лишь поверхностное электростатическое взаимодействие катионов с частицами). Наряду с гелем часто используют ионообменные смолы):

а, б — две стадии процесса; 1 — частицы геля; 2 — стенка колонки

фазная экстракция). Наиболее широко применяется водяной пар.

Адсорбция — распространенный метод отделения продукта — рассматривается как частный случай экстракции, при которой экстрагирующим агентом является твердое тело. Она заключается в связывании вещества поверхностью твердого тела из жидкой или газовой фазы. Традиционно применяемыми адсорбентами являются древесный уголь, глины с развитой пористой поверхностью. Путем адсорбции из культуральной жидкости выделяют антибиотики и витамины.

Современные методы разделения веществ. Они включают хроматографию, электрофорез, изотахофорез, электрофокусировку, основанные на принципах экстракции и адсорбции. Разделение веществ путем хроматографии связано с их неодинаковым распределением между двумя несмешивающимися фазами. Различают хроматографию на бумаге, пластинках, колонках. При хроматографии на бумаге или на пластинках одной из несмешивающихся фаз служит движущийся растворитель, например бутанол, а другой, неподвижной фазой — волокна бумаги или частицы покрывающего пластинку силикагеля или другого материала. При колоночной хроматографии подвижная фаза — текущий через колонку растворитель, неподвижная — заполняющий колонку адсорбент, чаще всего гранулированный гель. Разделяемая смесь вводится в контакт с подвижной и неподвижной фазами.

Колоночная хроматография допускает масштабирование — увеличение размеров и пропускной способности. Она применяется в промышленных условиях и имеет несколько разновидностей.

1. **Ионообменная хроматография** (рис. 12) — гранулы адсорбента, например карбоксиметилцеллюлозы, несут на себе заряженные группы, катионные ($-\text{NH}_3^+$) или анионные ($-\text{SO}_3^-$), способные к захвату ионов противоположного знака. Она применяется для выделения ионизированных соединений из жидкости, а также для очистки нейтральных соединений от примесей ионной природы. Одной из первых примененных в промышленных масштабах ионообменных колонок была колонка с естественным ионообменником цеолитом для смягчения воды, т. е. удаления из нее Ca^{2+} и Mg^{2+} . Ионообменные колонки с амберлитом широко применяют для отделения витамина B_{12} .

2. **Хроматография, основанная на разделении веществ с различной молекулярной массой и диаметром** (метод «молекулярных сит», **гель-хроматография, гель-фильтрация**). Частицы адсорбента захватывают и удерживают, скажем, только низкомолекулярные соединения, пропуская высокомолекулярные (рис. 13).

3. **Аффинная хроматография** — задерживается компонент, образующий прочный комплекс с лигандом, фиксированным на частицах носителя (рис. 14). Применяют агенты, специфически связывающие одно индивидуальное вещество. Например, фермент очищают путем связывания на колонке, несущей субстрат или специфический ингибитор (табл. 3).

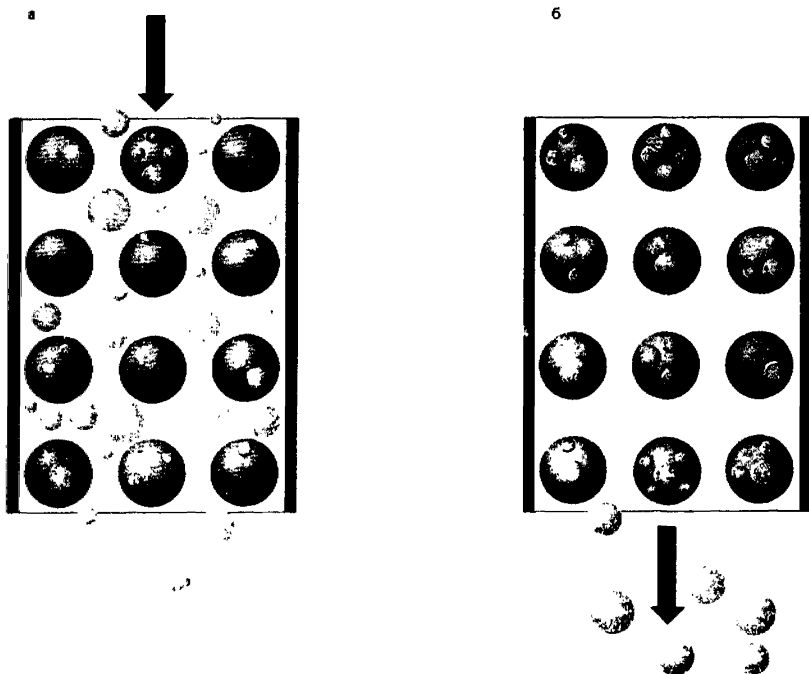


Рис. 13. Хроматография на основе «молекулярных сит» (Компоненты, размеры которых соответствуют размерам пор или входов в поры адсорбента, задерживаются на колонке):

а, б — две стадии процесса

Важную роль в отделении и очистке белковых и небелковых веществ играют взаимодействия антигенов и антител. Основанная на этих взаимодействиях хроматография получила название *иммунноаффинной*. Новые горизонты открыло перед *иммунноаффинной хроматографией* использование моноклональных антител (см. гл. 1, § 4), позволяющих провести за один этап 500-кратную очистку человеческого интерферона (J. C. Jansen, 1984).

В аффинной хроматографии используют также групповые лиганды, связывающие, например, целую группу сходных по структуре ферментов. К таким лигандам относятся кофакторы ферментов и их аналоги. В этом случае разделение и очистка индивидуальных веществ основана на их различном сродстве к лиганду, что позволяет собрать их порознь в виде отдельных фракций. Могут применяться и еще менее специфичные лиганды, связывающие целые классы веществ, например алкильные и арильные группы или лиганды, представляющие собой текстильные красители.

Аффинная хроматография может обеспечить полную очистку продукта из сложной многокомпонентной смеси — культуральной

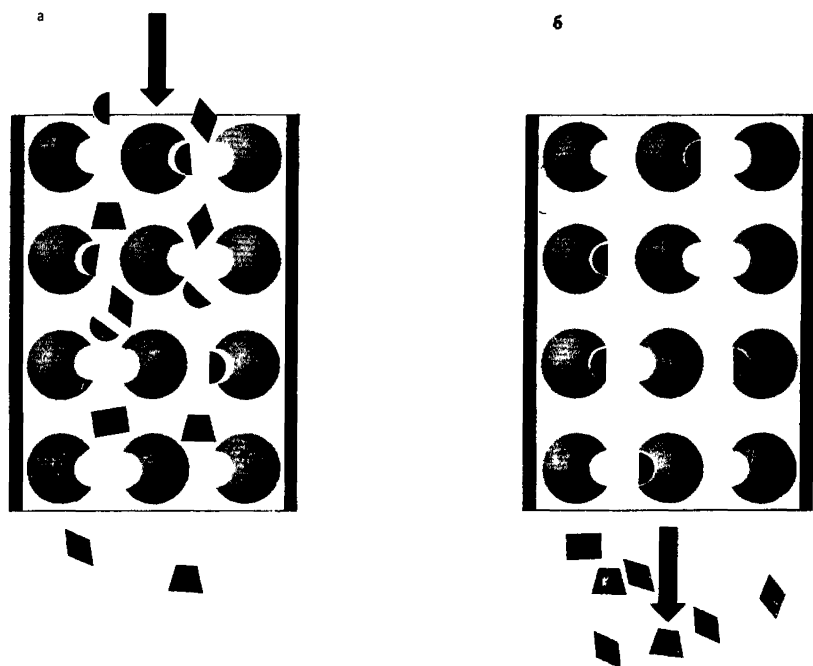


Рис. 14. Аффинная хроматография (В виде частиц различной формы изображены молекулы с различными химическими структурами, из которых только одна вступает в специфическое взаимодействие с частицами геля. Показано, что в выемки на частицах геля входят лишь молекулы комплементарной формы):

а, б — две стадии процесса

жидкости, экстракта клеток — в одну стадию, в то время как более традиционные методы осаждения и ионообменной хроматографии требуют многоступенчатой очистки, сопряженной с большими затратами труда и времени. Определенные неудобства вызывает относительная дороговизна материалов для аффинной хроматографии, в частности, веществ, используемых в качестве лигандов. Проблемой является также быстрый выход колонки из строя при пропускании через нее смесей, компоненты которых забивают промежутки между гелевыми частицами. Поэтому в производственных условиях колонки используются в периодическом, а не непрерывном режиме.

После пропускания через колонку порции культуральной жидкости, из которой выделяют продукт, частицы геля подвергают очистке. Методы очистки основаны на: а) использовании гелевых частиц, превышающих по плотности конгломераты веществ, закупоривающих колонку: различие в плотностях позволяет очистить гель путем его избирательного осаждения или проточной промывки, уносящей только загрязняющие частицы; б) придании частицам геля магнитных свойств, что позволяет провести их очистку в

Таблица 3*. Лиганды, широко используемые в различных вариантах аффинной хроматографии (по J. C. Jansen, 1984)

Лиганды	Отделяемый продукт	Лиганды	Отделяемый продукт
<i>Специфически связывающие индивидуальные вещества</i> Субстрат Кофактор (ко-фермент) Ингибитор Углевод Лектин Гормон Гепарин Антитело	Фермент Фермент (апо-фермент) Фермент Лектин Гликопротеид Рецептор Фактор коагуляции крови Антиген	Гаптен Полинуклеотид <i>Групповые</i> Алкильная или арильная группировки Функциональные группы органических красителей Агенты, хелирующие металлы Активированные SH-группы	Антитело Комплементарная нуклеотидная последовательность Различные белки То же — » — Белки с SH-группами

* Правая и левая колонки таблицы могут меняться местами, т. е. лиганды могут выступать в роли очищаемых продуктов.

градиентном магнитном поле; в) упаковке частиц геля в виде ленты, покрытой тонкоячеистой оболочкой: лента вращается и проходит попеременно через жидкость с неочищенным продуктом и через буферный раствор, в который переходят загрязняющие примеси (J. C. Jansen, 1984).

Масштабирование процесса аффинной хроматографии ограничивается разрушением структуры геля и уносом его частиц током жидкости. Это, в частности, обусловлено тем, что в широких колонках для крупномасштабной очистки продуктов стенки колонки уже не служат опорой для частиц геля, увлекаемых жидкостью. Увеличение высоты колонки приводит к пропорциональному возрастанию сил, разрушающих нижние слои геля. Помимо этого, для повышения эффективности и степени разделения близких по свойствам соединений целесообразно применять мелкие частицы геля (менее 1 мкм в поперечнике), но именно такие частицы легче всего увлекаются током жидкости. В последние годы изыскивают средства укрепления гелей для крупномасштабной аффинной хроматографии. Частицы агарозы — наиболее перспективного материала для гелей — предполагают укреплять путем сшивок.

Наряду с аффинной хроматографией, называемой также аффинной адсорбцией в геле, для крупномасштабного отделения и очистки продуктов биотехнологических процессов предполагают применять *аффинную преципитацию* и *аффинное разделение*. При аффинной преципитации лиганд прикрепляют к растворимому

носителю. При добавлении смеси, содержащей соответствующий белок, образуется его комплекс с лигандом, который выпадает в осадок сразу после его формирования или после дополнения раствора электролитом.

Аффинное разделение основано на применении системы, содержащей два водорастворимых полимера. Один из полимеров, например полиэтиленгликоль, несет специфические лиганды. Другой полимер, например высокомолекулярный декстран, обладает сродством к остальным, примесным компонентам. Так, содержащиеся в разделяемой смеси белки, нуклеиновые кислоты, фрагменты клеточных структур предпочитают более полярный декстран, тогда как целевой продукт, скажем, фермент, накапливается «в сетях» полиэтиленгликоля, несущего молекулы лиганда (субстрата, кофактора, ингибитора). Аффинное разделение представляет собой наиболее высокоэффективный из аффинных методов очистки. С применением полиэтиленгликоля-6000 с красителем Цибаكرون синий F3G-A в качестве лиганда проведена успешная очистка фосфофруктокиназы, выделенной из 1 кг дрожжей. Объем системы из двух полимеров составлял всего 250 мл, а очистка продолжалась менее 1 ч (J. C. Jansen, 1984).

Наряду с хроматографией перспективными для биотехнологии методами разделения веществ служат *электрофорез* и его модификации, например *изоэлектрическая фокусировка*. Разделяемую смесь помещают в мощное электрическое поле, приводящее в движение ее ионизированные компоненты. Направление и скорость перемещения ионов определяются знаком их заряда и другими характеристиками, в сумме обозначаемыми как *электрофоретическая подвижность*. Различие в электрофоретической подвижности позволяет пространственно разделить компоненты смеси. В современных вариантах электрофореза, как и в хроматографии, используют пластинки или колонки с наполнителем (агарозой, полиакриламидом, сефарозой, оксиапатитом), образующим гель.

В некоторых случаях используют градиентный гель, в котором плотность слагающих его частиц возрастает или убывает в направлении электрического поля линейно или экспоненциально. Применение градиентных гелей позволяет синхронизировать движение ионов, снизить величину разброса между их скоростями, так что ионы образуют при движении в геле компактный фронт, а не размытую широкую полосу.

Широко применяется двумерный электрофорез, при котором на разделяемую смесь действуют одновременно два электрических поля, направленные перпендикулярно друг другу. В этом варианте электрофореза получаются не линейно расположенные полосы, а распределенные по плоскости геля пятна, соответствующие разделенным компонентам смеси.

Проблемой, возникающей при масштабировании электрофоретических методов разделения и очистки, является разогревание геля под влиянием электрического поля. Для слоев геля толщи-

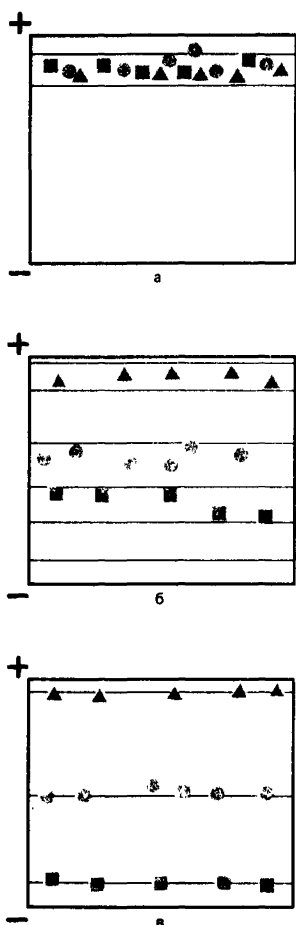


Рис. 15. Этапы изоэлектрической фокусировки (электрофореза в рН-градиентном геле):

а — образец нанесен на гель с кислотно-основными группами (амфолит); б — при наложении электрического поля амфолит формирует линейный рН-градиент, заряженные компоненты образца движутся в сторону электрода противоположного знака; в — по мере движения по рН-градиентному гелю частицы теряют электрический заряд, который обращается в ноль в зоне геля с рН, равным изоэлектрической точке соответствующего компонента. В этой зоне компонент концентрируется (фокусируется) в виде узкой полосы

ной 2 мм и более охлаждение становится непростой процедурой: угрозу представляет не только тепловая инактивация образца, например денатурация белка, но и возникновение в толще геля температурных перепадов, искажающих картину распределения компонентов, — электрофореграмму. В настоящее время разрабатываются системы электрофореза с термостатированными гелевыми пластинками (Е. Holmgren, S. Josephson, 1985).

Для более равномерного распределения полос, соответствующих разделяемым компонентам, разработан *электрофорез в неоднородном электрическом поле*. Напряженность поля убывает в направлении движения ионов. Это достигается применением гелей клиновидной формы (А. Olson et al., 1984). Другой путь — наведение внутри геля электрического поля, накладывающегося на внешнее, приложенное к гелю. Гель пропитывает смесью рН-буферов, дающей неравномерное распределение заряженных частиц по объему геля (буферный градиент). Результирующее электрическое поле (внутреннее и внешнее) при правильно подобранном буферном градиенте характеризуется напряженностью, монотонно убывающей в направлении движения ионов. Электрофорез в неравномерном электрическом поле широко применяется в генетической инженерии. Этим методом была проанализирована нуклеотидная последовательность гена инсулиноподобного фактора роста, синтезированного химическим путем (Е. Holmgren, S. Josephson, 1985).

Модификацией метода электрофореза является *изоэлектрическая фокусировка*, или *электрофокусировка* (рис. 15). Раствор, которым насыщают гель, содержит соединения с кислотно-основными группами. Гель помещают между двумя электродами, и под влиянием электрического поля кислотно-основ-

ные группы буферного соединения меняют степень ионизации. Образуется градиент pH в направлении электрического поля. Нагель наносят образец разделяемой смеси, и ее электрически заряженные компоненты мигрируют по направлению к электроду противоположного знака. Поскольку заряженные компоненты движутся по градиенту pH, они постепенно теряют свой заряд и в зоне, где pH соответствует точке электронейтральности (изоэлектрической точке) компонентов, их движение прекращается. Каждый компонент концентрируется (фокусируется) в определенной зоне геля.

В современных системах часто используют электрофокусировку в гелях с иммобилизованными (ковалентно связанными с частицами геля) кислотнo-основными группами. Подобный гель обозначают как иммобилиновый. С помощью электрофокусировки в иммобилиновом геле показана микрогетерогенность моноклональных антител, т. е. присутствие в них незначительно различающихся по электрофоретической подвижности компонентов (E. S. Bos et al., 1984).

Важную модификацию электрофореза представляет иммуно-электрофорез. В одном из вариантов метода, называемом ракетным иммуноэлектрофорезом, антитело добавляют к гелю, а материал, содержащий антиген, вносят в лунку на краю гелевой пластинки. При наведении в геле электрического поля антиген электрофоретически перемещается по гелю, и зона его распространения очерчивается хорошо видимой контурной линией — зоной образования комплекса антиген — антитело. Контурная линия напоминает по форме ракету, отсюда и название ракетный иммуноэлектрофорез.

Усложненный вариант иммуноэлектрофореза — перекрестный, или двумерный иммуноэлектрофорез, позволяющий разделить многокомпонентные смеси (рис. 16). Образец вносят в лунку на краю гелевой пластинки и электрофоретическим путем «прогоняют» компоненты образца по всей длине геля, пока самый подвижный компонент не приблизится к противоположному краю геля. Получается продольная дорожка на геле, которую вырезают и переносят на другую гелевую пластинку, причем эту дорожку ориентируют поперек направления электрического поля. Второй гель содержит антитела к одному или нескольким компонентам смеси, и после электрофореза на нем образуются «ракеты», каждая из которых соответствует определенному антигену — компоненту смеси.

Из других модификаций электрофореза отметим *изотахофорез*, основанный на разделении ионных компонентов смеси с различной электрофоретической подвижностью. Используют два электролита, например трис-Cl и трис-глицин. Анионы Cl^- имеют большую электрофоретическую подвижность, чем анионы глицина. Соответственно трис-Cl называется лидирующим, а трис-глицин — терминирующим электролитом. Анионные компоненты, которые могут быть разделены в такой системе электролитов,

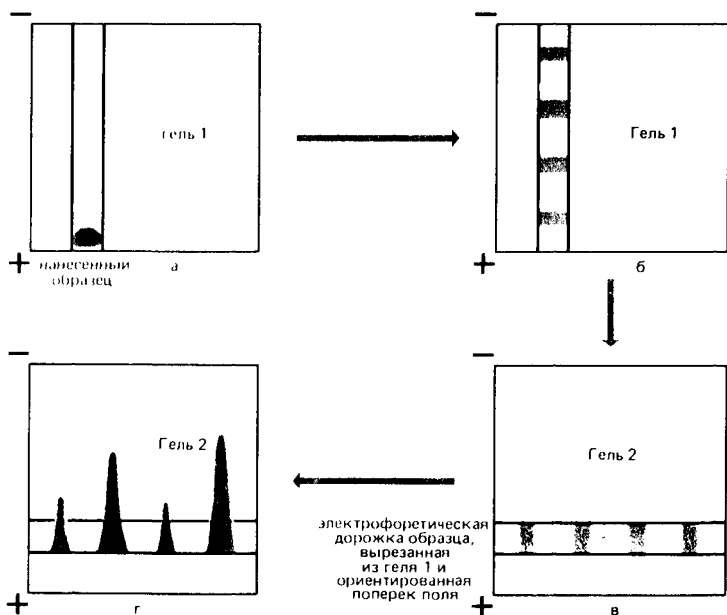


Рис. 16. Этапы перекрестного (двумерного) иммуноэлектрофореза:

а — образец наносят на обычный гель для электрофореза; б — при наложении электрического поля компоненты образца распределяются в геле; в — «дорожку» с компонентами образца вырезают из геля 1 и переносят на гель 2 с антителами к некоторым или всем компонентам; «дорожку» ориентируют перпендикулярно направлению электрического поля, прикладываемому к гелю 2; г — компоненты смеси образуют пятна в виде «ракет», соответствующие зонам взаимодействия антиген — антитело

должны обладать электрофоретической подвижностью, промежуточной между электрофоретической подвижностью анионов Cl^- и глицина. Разделяемую смесь вносят в гель на границу раздела лидирующего и терминирующего электролита (рис. 17). При наложении электрического поля высокой напряженности анионные компоненты смеси образуют в геле четко разграниченные зоны. Скорость их движения совпадает со скоростью перемещения ионов лидирующего и терминирующего электролита, поэтому метод и получил название изотахофореза — движение (форез) с одинаковой (изо) скоростью (тахо).

Из рассмотренных методов разделения и очистки веществ лишь немногие, кроме ионообменной и аффинной хроматографии, внедрены в крупномасштабное производство. Прочие методы ограничены лабораторным применением. Однако среди биотехнологических продуктов немало и таких, которые производятся пока в масштабах, не перешагнувших уровень лабораторных биореакторов. В таких разработках используются тонкие препаративные методы разделения. Отметим разработки по получению полинуклеотидфосфорилазы *E. coli* (С. Н. Загребельный и др., 1985),

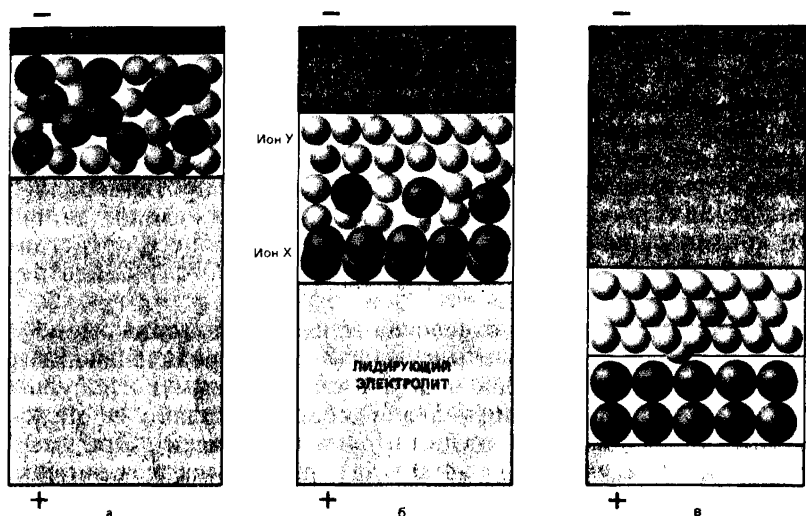


Рис. 17. Этапы изотахофореа:

а — образец с анионами X^- и Y^- вносят на границу зон лидирующего и терминирующего электролитов; б, в — этапы разделения анионов при перемещении в электрическом поле

ДНК- и РНК-лигаз (З. А. Баронайте и др., 1985), целлюлаз и глюкоамилазы (М. В. Гернет, 1985 а, б). Некоторые продукты (лекарства, ферменты для аналитических целей) нецелесообразно масштабировать, так как спрос может быть удовлетворен производством в биореакторах лабораторного масштаба. Тонкие препаративные методы имеют перспективы для своего масштабирования за счет увеличения габаритов соответствующих установок.

Происходит также совершенствование испытанных методов очистки веществ. Так, значительная степень очистки ферментов может быть обеспечена простым нагреванием. Ю. И. Венюжинскене и др. (1985) добились 9-кратной очистки α -амино- ϵ -капролактамагидролазы, подобрав оптимальные условия термообработки гомогената клеток продуцента *Cryptococcus sp.*: нагрев до 68°C при pH 6,3 в течение 15 мин. Среда содержала пиридоксальфосфат, предохранявший целевой фермент от тепловой денатурации.

§ 4. Концентрирование продукта

За отделением продукта следует его *концентрирование*. Основные методы концентрирования — обратный осмос, ультрафильтрация, выпаривание.

Если мембрана пропускает воду, задерживая растворенные в ней вещества, речь идет об *осмосе*. Прямой осмос — диффузия

веществ через мембрану, разделяющую раствор и растворитель. Как правило, раствор помещают в мешок из полупроницаемого материала, и этот мешок погружают в сосуд с растворителем. Растворитель, поступающий извне, оказывает на мешок давление, называемое осмотическим. Если к раствору приложить внешнее давление, превышающее осмотическое, то растворитель вытекает через полупроницаемую мембрану против градиента концентрации растворенного вещества, т. е. происходит дальнейшее концентрирование раствора. Подобный процесс представляет собой *обратный осмос*, используемый как метод концентрирования продукта.

Ультрафильтрация — отделение веществ с помощью мембранных фильтров. Некоторые марки фильтров предназначены для отделения лишь сравнительно крупных частиц: иммуноглобулинов, коллоидных агрегатов, вирусов. Мембраны с наиболее мелкими порами задерживают молекулы органических кислот. При умеренно высоком давлении (200—400 кПа), приложенном к жидкости, скорость ее потока через фильтр достаточно высока для быстрой и эффективной ультрафильтрации. Технология ультрафильтрации подкупает своей простотой, относительной экономичностью и мягким, щадящим обращением с продуктом. Здесь не требуется изменения pH, ионной силы раствора или перевода продукта в другую фазу. Этим объясняется перспективность ультрафильтрации для концентрирования таких малостабильных продуктов, как молочная и глутаминовая кислоты, некоторые антибиотики и ферменты (H. Dellweg, 1983), витамин B₁₂ (B. Sikyta, 1984e).

Метод выпаривания, наиболее древний и известный еще алхимикам, обладает очевидным недостатком: для удаления воды или иного растворителя раствор необходимо нагревать. В производственных условиях чаще используют вакуум-выпарные аппараты, и температура выпаривания, соответственно и вред, причиняемый термолабильным веществам, могут быть снижены в зависимости от уровня снижения давления в выпарном аппарате по сравнению с атмосферным. Нагревающим агентом чаще всего служит водяной пар, хотя используют также обогрев жидким теплоносителем или электрообогрев. Пар характеризуется большой теплотой конденсации и облегчает регулировку процесса выпаривания.

Выпарные аппараты бывают периодически и непрерывно действующие, с однократной и многократной циркуляцией кипящего раствора. Теплообмен между нагревающим агентом и выпариваемым раствором обеспечивается системой труб, змеевиков или паровой рубашкой. Необходимо добиваться равномерного обогрева раствора без локального перегрева. Перспективные методы выпаривания чувствительных к нагреванию веществ состоят в использовании дисковых и пленочных выпарных аппаратов, в которых испарение стимулируется в результате растекания жидкости тонким слоем по нагретой поверхности.

Выпаривание может быть ограничено стадией получения густого сиропообразного раствора целевого продукта. В этом случае вся процедура называется упариванием, а полученный продукт относится к категории жидких. Исчерпывающее удаление влаги, оставшейся после упаривания, обратного осмоса, ультрафильтрации, ведет к получению «сухого продукта» и выделяется технологами в особую стадию — обезвоживание продукта (сушка).

§ 5. Обезвоживание продукта

В распоряжении биотехнолога имеются различные методы сушки. Их выбор зависит от физико-химических свойств обезвоживаемого продукта, в частности, от вязкости раствора и от стабильности или жизнеспособности при повышенных температурах, если речь идет о живых объектах. Наиболее старым методом можно считать сушку на подносах. Для сушки термостабильных антибиотиков и аминокислот применяют модификацию метода — ленточную сушку. Подносы в этом случае заменяют на ленточный конвейер, ленту постоянно подогревают.

Перспективным методом является сушка в кипящем слое. Газообразный нагревательный агент (пар, воздух, CO_2 , дымовые или топочные газы) мощной струей врывается в сушильный аппарат снизу, и частицы обезвоживаемого продукта парят в газовом потоке. Принципиально аппарат совпадает с газофазным биореактором (см. гл. 2, § 5).

Преимуществом метода является возможность регулирования в широких пределах продолжительности пребывания материала в аппарате, интенсивности массопередачи и теплообмена, возможность организовать непрерывный процесс при простой конструкции аппарата (В. А. Быков и др., 1985). Ограничение метода состоит в том, что материал не должен приставать к стенкам сушильного аппарата. Метод пригоден для сушки антибиотиков, аминокислот, крахмала, но не суспензий клеток (В. Sikyta, 1984e).

Барабанные сушилки, в которых обезвоживают микробные суспензии, состоят из вращающихся подогреваемых барабанов, погруженных в сосуд с суспензией. Соприкасаясь с барабаном, суспензия обезвоживается и присыхает в виде пленки к его стенкам. Высохшую биомассу соскребают со стенок ножом.

Особо чувствительные к нагреву материалы сушат в вакуум-сушильных шкафах, при пониженном давлении и температуре. Проблемы с этим видом сушильных аппаратов связаны с трудностью их обслуживания в промышленных условиях и частым выходом аппаратов из строя.

Распылительные сушилки превращают раствор или суспензию в аэрозоль путем пропускания под давлением через форсунку, вращающийся диск и т. д. Аэрозоль подается в сушильную камеру, где его встречает нагретый газ — теплоноситель с температурой 110—150°C. Воздействие столь высокой температуры огра-

ничивает использование метода для сушки термолабильных веществ и живых клеток. В производстве сухих силосных заквасок на основе молочнокислых бактерий выход жизнеспособных клеток после распылительной сушки не превышает 20—30% (Н. В. Бубнов и др., 1985).

Разрабатываются низкотемпературные режимы сушки, для эффективного осуществления которых необходимо тщательно удалять влагу из газа-теплоносителя и обеспечить тонкодисперсное распыление исходной суспензии. Другой проблемой, присущей методу распылительной сушки, является налипание продукта на стенки сушильной камеры. Капли суспензии или раствора достигают стенок камеры раньше, чем успевают подсохнуть. Налипание влажных частиц на стенки вызывает нарушение стабильной работы всего сушильного аппарата. Предлагается понижать вязкость исходной суспензии (раствора), что достигается путем нагревания, уменьшения в ней содержания веществ и установки оптимального рН (Э. Г. Тутова и др., 1985). Каждый из этих способов понижения вязкости не лишен, однако, своих проблем. Например, повышение температуры вызывает угрозу инактивации целевого продукта.

Полученный сухой продукт поступает на хранение после придания ему товарного вида. Возможен также вариант химической модификации продукта.

§ 6. Пути модификации продукта

Химическая модификация необходима в тех случаях, когда биотехнологический процесс сам по себе дает лишь «заготовку» целевого продукта. Так, антибиотик, продуцируемый микробной культурой, путем химических перестроек может быть превращен в различные медицинские препараты. Пенициллин G, образуемый *Penicillium notatum*, модифицируют с целью получения ампициллина, метициллина и других полусинтетических пенициллинов. В некоторых случаях достаточно, чтобы организм синтезировал определенную структуру, к которой химическим путем присоединят необходимые заместители.

Иногда биообъект участвует лишь на одном каком-либо этапе (или немногих этапах) в цепи химических процессов, ведущих к синтезу целевого продукта. Важный пример — придание продукту оптической асимметрии, что позволяет избежать трудоемких химических синтезов. Биообъект (скажем, дрожжи) избирательно потребляет один из изомеров (например, только *L*-аминокислоты), в среде остается его оптический антипод. Подобная технология известна со времен Луи Пастера. Биообъект в подобных случаях уподобляется одному из реактивов в наборе химика-органика, т. е. речь идет о микробной, говоря шире, биотехнологической химии (Г. К. Скрябин, Л. А. Головлева, 1985).

Модификация — необходимый этап в получении ряда ферментов, гормонов, препаратов медицинского назначения. Речь идет

о перестройке соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств, необходимых человеку. У бычьего инсулина «отстригают» аминокислотные остатки, после чего он становится идентичным человеческому гормону.

Генно-инженерные белки часто наряду с нужными человеку несут балластные аминокислотные последовательности. Короткие пептиды (соматостатин и др.) обычно получают в составе химерных белков, включающих аминокислотную последовательность β -галактозидазы *E. coli* или другого бактериального белка. Химическая модификация сводится в этом случае к отщеплению лишних аминокислотных последовательностей. Если продукт получают в виде мультимера (способ защиты от внутриклеточных протеаз), необходимо его последующее «нарезание» на функционально активные мономеры.

§ 7. Стабилизация продукта

Мероприятия, направленные на сохранение свойств продукта в период его хранения и использования потребителем, включают различные физико-химические воздействия на продукт. Так, сушка может значительно повысить устойчивость продукта к внешним воздействиям. Показано, что обезвоживание ряда ферментов наряду с некоторым снижением их активности ведет к повышению их стабильности, включая устойчивость к нагреванию. Панкреатическая липаза свиньи, сразу теряющая активность в водной среде при нагревании до 100°C, функционирует более двенадцати часов при той же температуре в смеси гептанола и трибутирина. Физические воздействия, используемые для консервации живых объектов, рассмотрены в гл. 1, § 6.

К стабилизации различных продуктов, в том числе кормового микробного белка, ведет добавление наполнителей из грибного мицелия, пшеничных отрубей, кукурузной муки, которые сами обладают питательной ценностью (Е. Ю. Двойченкова, В. М. Кантере, 1985). Стабилизация ферментов достигается добавлением глицерина или углеводов, которые образуют многочисленные водородные связи с аминокислотными остатками, препятствуя тем самым спонтанной (при длительном хранении) или индуцированной нагреванием денатурации ферментов (А. Freeman, 1984). Стабильность ферментов возрастает также при добавлении неорганических ионов — Co^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} для пектиназы, формалина — 0,2%-ного раствора для глюкоамилазы, антибиотиков — низина для глюкоамилазы (Е. Ю. Двойченкова, В. М. Кантере, 1985).

В некоторых случаях стабилизация не исчерпывается физико-химическими средствами и представляет собой задачу особого биотехнологического процесса. Меланж, получаемый из яичных желтков, — ценный пищевой продукт, через несколько месяцев хранения темнеет, его органолептические свойства ухудшаются.

Порча меланжа может быть предотвращена, если из него удалить углеводы. С этой целью на меланже рекомендуется выращивать пропионовые бактерии, «выедающие» углеводы. Это приводит к значительному удлинению срока хранения меланжа. В то же время пропионовые бактерии повышают питательную ценность меланжа, обогащая его органическими кислотами и витамином В₁₂ (Л. И. Воробьева, 1986).

Цели стабилизации белковых продуктов преследуют методы белковой инженерии (см. гл. 1, § 3). Эти методы позволяют повысить стабильность продуктов при длительном хранении и их устойчивость к нагреванию. Важность повышения термостабильности белков, особенно ферментов, находится в тесной связи с расширением области применения термофильных процессов в современной биотехнологии. Представляет интерес увеличение термостабильности лизоцима фага Т4 *E. coli*. Путем генных манипуляций в положении 3 полипептидной цепи лизоцима заменен изолейцин на цистеин, так что образовалась новая дисульфидная связь с цистеином в положении 97. Это обусловило резкое повышение термостабильности лизоцима (В. Г. Дебабов, 1985).

Принципиально новые возможности для стабилизации ферментов и целых клеток биообъекта открывает их иммобилизация.

4

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ
ФЕРМЕНТЫ
И БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Химическая модификация ферментов, их перенос в неводную среду, обработка с целью стабилизации, белковая инженерия (см. гл. 3, § 6, 7) — все эти методы относятся к компетенции *инженерной энзимологии*. Центральный метод инженерной энзимологии — *иммобилизация ферментов*. Иммобилизация — ограничение подвижности молекул ферментов, их конформационных перестроек — основана на физико-химических принципах, позволяющих закрепить структуру фермента таким образом, чтобы активный центр его молекулы сохранял свою работоспособность (каталитическую активность) в течение длительного времени, не подвергаясь структурным изменениям, приводящим к нарушению его конфигурации (рис. 18).

Способы иммобилизации — прикрепление ферментов к поверхности природных или синтетических носителей (адсорбция, химическое связывание), включение ферментов в полимерные гели, мембранные капсулы, полые волокна, поперечная сшивка ферментных молекул. Процессы с использованием иммобилизованных ферментов экономически эффективны. Так, получение фруктозы из глюкозы с применением глюкоизомеразы стало дешевле почти вдвое в результате перехода на технологию, основанную на иммобилизованных ферментных препаратах (А. А. Клесов, 1982).

При иммобилизации ферменты из разряда гомогенных катализаторов (находящихся в той же фазе, что и субстраты реакции) переходят в разряд гетерогенных (образующих особую фазу, отделенную от реагентов). Фермент и реагенты могут быть разделены, что позволяет: а) в нужный момент остановить реакцию; б) регенерировать фермент после окончания реакции и использовать его для нового цикла биотехнологического процесса; в) получить продукт реакции без примеси фермента, что имеет особое значение для пищевой и фармацевтической промышленности.

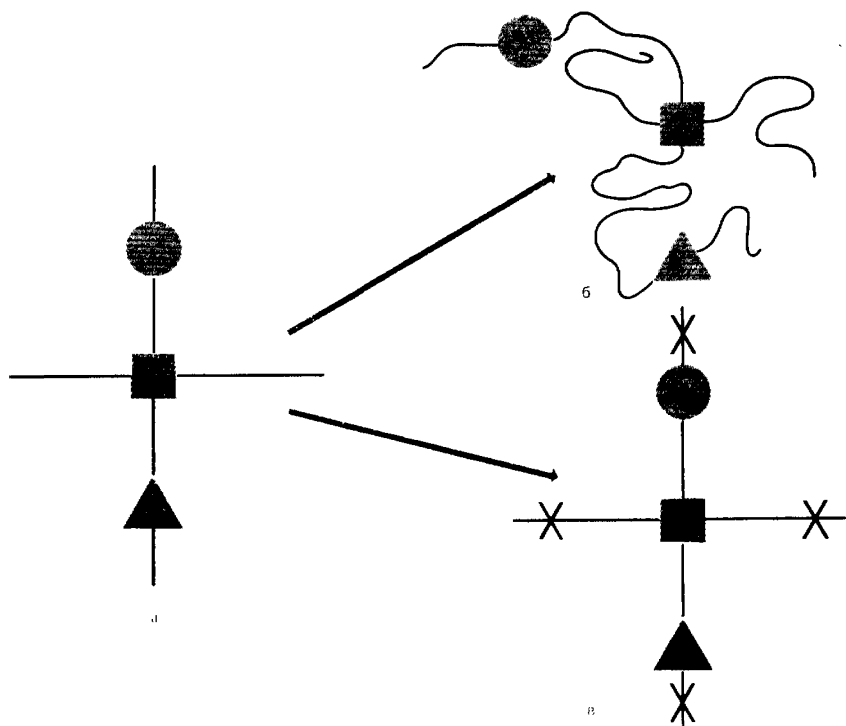


Рис. 18. Активный центр фермента (а) и его изменения, приводящие к потере активности (б) или стабилизации путем иммобилизации (в)

Процесс можно многократно реализовать в периодическом режиме с использованием одного и того же ферментного препарата. Еще важнее возможность непрерывного режима с использованием известного в химической технологии принципа взаимодействия подвижной и неподвижной фаз. Подвижная фаза — раствор, суспензия, эмульсия реагентов — протекает через реактор, заполненный насадкой с иммобилизованным на носителе биокатализатором.

Фактором, способствующим длительному, в том числе непрерывному, функционированию иммобилизованных биокатализаторов, является их повышенная стабильность, сохранение активности в течение длительного времени как при хранении, так и в ходе биотехнологического процесса.

Принципы иммобилизации ферментов распространились на клетки и их органеллы как полиферментные системы.

Изолированные ферменты и клетки при иммобилизации приобретают свойства, не характерные для них в свободном состоянии.

§ 1. Методы иммобилизации

Методы иммобилизации являются общими для всех типов биокатализаторов — ферментов, клеток, клеточных органелл, комбинированных препаратов (рис. 19). Однако специфика каждого из них должна быть учтена при выборе предпочтительного метода иммобилизации и конкретных условий его реализации.

Иммобилизация путем адсорбции или химической сшивки. В рамках этого метода биообъект фиксируют на поверхности неорганических (силикагель, пористое стекло, песок, обожженная глина, керамика, бентонит, гидроксид титана, циркония, железа и т. д.) и органических (целлюлоза, хитин и их производные, ионообменные смолы, оксиалкилметакрилат, глицидилметакрилат, нейлон, полиэтилен, полистирол) носителей. Имеется тенденция ко все более широкому применению материалов, получаемых путем прививки одного полимера к другому — поли (малеиновый ангидрид/стирол)-полиэтилен или поли (малеиновый ангидрид / винилацетат)-полиэтилен (С. G. Beddows, 1985). Материалы разнообразны. Различны также механизмы и прочность связей между биокатализатором и носителем — имеется гамма переходов от простого обрастания носителя через физическую адсорбцию, полярные и ионные взаимодействия к координационным и ковалентным химическим связям. Примером разработки, где носителю отводят лишь роль арматуры, является культивирование клеток млекопитающих в биореакторах для получения гормонов и других ценных продуктов. Известно, что рост клеток стимулируется их фиксацией (заякориванием) на твердом субстрате. Фиксация обеспечивается, в частности, насадкой из частиц ДЭАЭ-сефадекса (W. S. Hu et al., 1985). Контакт «клетка (субклеточная структура, фермент) — носитель» прочнее при адсорбции под влиянием дисперсионных, полярных и ионных взаимодействий.

Одним из методов широко практикуемой ныне иммобилизации дрожжевых / бактериальных клеток для получения этанола служит их сорбция за счет ионных сил на микропористой ионообменной смоле (A. J. Daugulis et al., 1985). Адсорбируют аминоксиллазу для промышленного разделения смесей *L*- и *D*-аминокислот (японская фирма «Танабэ сэйяку»). Клетки дрожжей, адсорбированные на керамике и других носителях, обладают большей дыхательной активностью, чем свободные дрожжевые клетки (V. Vojtisek, V. Jirku, 1984).

В современных разработках прослеживается тенденция к использованию синтетических крупнопористых материалов, своеобразных «губок», впитывающих клеточную массу. Распространенным губчатым материалом служит полиуретан, образующий твердую «пену» с открытыми ячейками. Этот материал в виде мелко нарезанных частиц помещают в биореактор с клетками. Клетки, проникая в ячейки носителя, быстро растут. Такая система применяется в очистке сточных вод (R. P. Triolo, 1985).

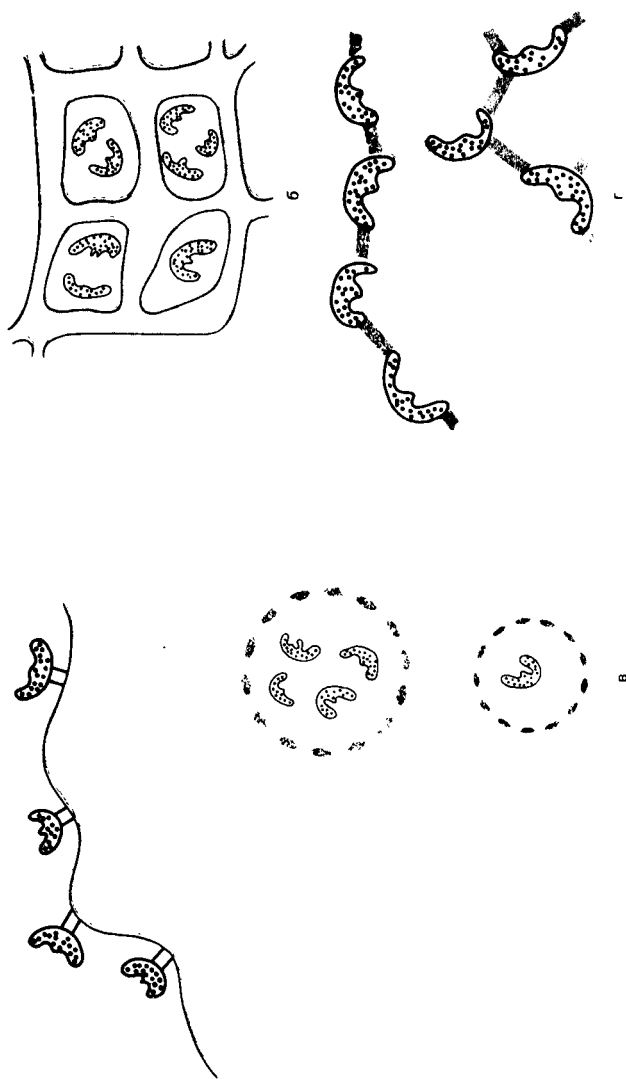


Рис. 19. Основные методы иммобилизации биокаталитических систем:
a — адсорбция или химическое связывание на поверхности; *b* — включение в полимерную структуру; *в* — инкапсулирование; *г* — поперечная сшивка с помощью би- или полифункциональных агентов

Этот пример говорит о простоте рассматриваемого метода иммобилизации. Она сводится к добавлению частиц носителя в теремешиваемую суспензию клеток или пропусканию такой суспензии через колонку с частицами носителя. Для иммобилизации без химической сшивки характерно слабое влияние носителя на свойства биокаталитической системы. Ферменты сохраняют свою природную активность, а клетки — жизнеспособность. В то же время непрочный характер связи носителя с ферментом (клеткой) ведет к их десорбции, снижающей надежность метода.

Относительно более прочными являются ионные взаимодействия, при которых адсорбция поддерживается при определенных рН и ионной силе оmyвающего раствора. Для ионной адсорбции применяют различные носители. Если необходимо регенерировать биокатализатор, то заменой раствора можно десорбировать фермент (клетки), т. е. взаимодействия биокатализатора и носителя могут быть поставлены под контроль технолога.

Однако взаимодействия между биокатализатором и носителем теряют прочность при высокой ионной силе раствора, например при получении аспарагиновой кислоты из фумарата аммония. В этих условиях надежнее адсорбция на принципах дисперсионных (гидрофобных) взаимодействий. Используемый для получения аспарагиновой кислоты фермент аспартазу адсорбируют на хлопчатобумажной ткани, к поверхности которой пришиты гидрофобные алкильные или арильные группы (Н. Yamasaki et al., 1986).

Что касается прочной химической сшивки биокатализатора с носителем, то этот метод претерпел долгую историю, связанную с теоретическими исследованиями. Он допускает многочисленные модификации. Практически все функциональные группы белков (α - и ϵ -аминогруппы, α -, β -, γ -карбоксильные группы, сульфгидрильные группы цистеина, ароматические кольца тирозина и триптофана, имидазольная группа гистидина, гидроксильная группа аминокислот) могут быть использованы для сшивки биокатализатора и носителя. В частности, широко применяют реакции, ведущие к образованию пептидных связей между аминокруппами биокатализатора и карбоксильными группами носителя или, наоборот, между карбоксильными группами катализатора и аминокруппами носителя. Для реакции необходим водоотнимающий агент, например дициклогексилкарбодимид. Многообразны сшивающие агенты. К ним относятся также сульфурилхлорид, гидразин и др. Они образуют различные связи между биокатализатором и носителем. Например, бромциан и



Проводят реакции между носителем и биокатализатором без участия сшивающих агентов. Одна из подобных реакций зависит от наличия в химической структуре носителя групп $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ (остаток малеинового ангидрида), которые выступают в прямое

взаимодействие с аминокруппами катализатора, образуя пептидные связи. Для реализации подобной реакции к синтетическим полимерным материалам прививают дополнительные структуры, содержащие малеиновый ангидрид. Таким способом успешно иммобилизованы бычий сывороточный альбумин, глюкозооксидаза, щелочная фосфатаза, клетки *Bacillus stearothermophilus* (C. G. Beddows et al., 1985).

Использование привитых полимеров — плодотворный и перспективный подход. Прививая к полимеру те или иные боковые ветви, можно гибко регулировать его свойства и реакционную способность, создавать на его поверхности микроокружение, оптимальное для стабильного функционирования биокатализатора. Представляет интерес иммобилизация микросом на полиэтилене с привитыми полиакриловой кислотой и поливиниловым спиртом. В этих условиях микросомы сохраняют высокую, стабильную монооксигеназную активность. Дополнительной стабилизации ферментативной активности способствует добавление глицерина — пример успешного сочетания двух методов стабилизации фермента: иммобилизация в сочетании с обработкой стабилизирующим агентом (Т. И. Давиденко и др., 1985).

Иммобилизация путем химического присоединения биокатализатора к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Влияние иммобилизации на активность фермента (клеток) различно и определяется как непосредственным изменением структуры фермента, его конформации, так и диффузионными ограничениями для доступа субстрата (кофактора). С целью уменьшения диффузионных затруднений для ферментативной реакции биокатализатор иногда выводят из микроокружения молекул носителя. Его пришивают к носителю через спейсер, достаточно длинную последовательность химических группировок. Например, при иммобилизации галактозилтрансферазы на сефарозе между носителем и ферментом вставляют последовательность $-\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}-$ (A. G. Demers, S. S. Wong, 1985). Проблемой является выбор оптимальной длины спейсера, при которой предотвращаются нежелательные последствия иммобилизации (диффузионные затруднения, искажение структуры биокатализатора) и в полной мере используются ее полезные эффекты (прочная фиксация биокатализатора и его длительное функционирование).

С целью снижения отрицательного влияния химической сшивки с носителем на функционирование фермента (клетки) проводят удаление места сшивки от активного центра фермента (соответственно от жизненно важных органелл клетки). Если фермент имеет гликопротеидную природу, ковалентную сшивку проводят по углеводной, а не белковой части ферментной молекулы. Спиртовые группы сахаров окисляют периодатом до альдегидных групп, которые затем вводят в реакцию с аминокруппами носителя (J. Kaš et al., 1984).

Как особый случай без использования сшивающего агента

можно рассматривать иммобилизацию клеток на носителях из полимерных гидроксидов циркония, титана, олова и железа (V. Vojtisek, V. Jirku, 1984). Гидроксильные группы вытесняются из координационной сферы того или иного металла функциональными группами клеточных стенок. Между носителем и биокатализатором устанавливаются координационная или ковалентная связь.

Иммобилизация путем включения в полимерную структуру. Таким методом биокатализатор вносят в полимерную структуру: получают гранулы, пленки, волокна, несущие биокатализатор. Метод перспективен, в особенности в применении к целым клеткам. Клетки сохраняют жизнеспособность и высокую каталитическую активность, способны реализовать многостадийные, полиферментные реакции. Применяют как природные, так и синтетические полимерные материалы: альгинат, каррагинан, коллаген, желатину, целлюлозу, хитин, полиакриламид, фоточувствительные полимеры.

Способ включения биологического материала в полимерную структуру определяется спецификой полимера. Полимеризация альгината и каррагинана, добываемых из морских водорослей, зависит от Ca^{2+} (для альгината) и Al^{3+} , Mo^{2+} , Fe^{3+} , K^{+} и NH_4^{+} (для каррагинана). Биокатализатор вносят в раствор мономеров альгината/каррагинана и полученную смесь по каплям добавляют в водный раствор соответствующих катионов. Образуются сферические полимерные частицы, несущие иммобилизованный биокатализатор.

Важным технологическим параметром является однородность полученных гранул. Однородные гранулы образуются при пропускании раствора «будущего полимера» с биокатализатором через специальные иглы, формирующие капли стандартных размеров. Предложена новая и, по-видимому, более перспективная технология, основанная на образовании однородных капель при разрыве струи жидкости под влиянием резонанса, создаваемого специальным вибратором (A. C. Hulst et al., 1985). Эта технология успешно применена при получении гранул альгината кальция со включенными клетками пекарских дрожжей и клетками растения *Nauphorappus gracilis*. Используют также приспособления типа пульверизатора, дающего мелкие (менее 1 мм) однородные капли (T. Rehg et al., 1986).

Описанную методику получения гранул альгината/каррагинана обозначают как внешнее гелеобразование, противопоставляя ей разработанную в последние годы методику внутреннего гелеобразования. К раствору альгината/каррагинана, содержащему биокатализатор, добавляют соли (например, цитрат кальция для альгината), смесь оставляют на два часа для гелеобразования. Достоинством метода является возможность изготовить гель, однородный по всему объему использованного сосуда (A. Johansen, J. M. Flink, 1986).

Иммобилизация в полиакриламидном геле (ПААГ) состоит

во внесении биокатализатора в раствор мономера (акриламида), причем к поверхностным функциональным группам биокатализатора присоединяют аналог мономера — N,N'-метилендиакриламид. При соответствующих условиях формируется полимер, в который ковалентно вшит биокатализатор. Иммобилизация в коллагене сводится к интенсивному перемешиванию клеток в водной среде, содержащей частицы этого нерастворимого в воде белка. Когда используют желатину или агар-агар, то биокатализатор вносят в нагретый раствор этих полимеров с последующим охлаждением, вызывающим гелеобразование.

Полимерные материалы различаются по своим свойствам и области применения в качестве носителей биокаталитических систем. Альгинат дает гели с высокой прочностью и хорошими гидродинамическими свойствами (К. А. Кошеченко, 1985). Клетки грибов, бактерий и растений в альгинатном геле нормально растут и размножаются. Включение в альгинатный гель побуждает клетки экскретировать продукты, которые они в свободном состоянии накапливают внутриклеточно. Так, клетки мака *Papaver somniferum* экскретируют производные кодеина, а клетки *Morinda citrifolia* — до 90% синтезированного L-диоксифенилаланина, ценного лекарственного соединения (O. Sahai, M. Knuth, 1985).

Каррагинан используют для иммобилизации ферментов (J. Kaš et al., 1984) и клеток (Г. К. Скрябин, К. А. Кошеченко, 1984; К. А. Кошеченко, 1985; V. Vojtisek, V. Jirku, 1984). Клетки дрожжей — продуцентов этанола — в нем сохраняют каталитическую активность, как и в альгинате (O. Agrawal, V. K. Jain, 1986). Однако каррагинан образует недостаточно прочные полимерные гранулы, легко разрушаемые при росте клеток и механическом перемешивании в заполненном гранулами биореакторе (М. И. Волошенко и др., 1985; К. А. Кошеченко, 1985; O. Agrawal, V. K. Jain, 1986). Укрепление геля и одновременно дополнительное повышение стабильности содержащихся в нем катализаторов достигается сшивкой гелевых частиц и биокатализаторов с помощью глutarового альдегида (см. гл. 4, § 1). Однако такая обработка приводит к гибели клеток, они сохраняют способность к катализу лишь одностадийных реакций.

ПААГ — сравнительно «старомодный» полимерный материал. Он с успехом применялся на изолированных ферментах и клетках микроорганизмов. Однако он уступает по своим свойствам альгинату и каррагинану. В исследовании с *Pseudomonas putida* показана низкая эффективность ПААГ как иммобилизующего агента: лишь относительно малая доля клеток фиксируется в ПААГ в сопоставлении с каррагинаном и альгинатом (М. И. Волошенко и др., 1985). Замена ПААГ на каррагинан дала японской фирме «Танабэ Сэйяку» возможность повысить в 2,3 раза эффективность синтеза аспарагиновой кислоты с применением иммобилизованных микробных клеток. Недостаточная механическая прочность ПААГ ограничивает область его применения.

Это ограничение может быть снято при использовании ПААГ, содержащего жесткую арматуру из керамики (Н. Н. Зуева и др., 1980).

Иммобилизация путем инкапсулирования. В рамках этого метода биокатализаторы покрывают специальными полупроницаемыми оболочками, изготовленными из различных материалов — целлюлозы, полиакрилата, полистирола, полиуретана, полиэфиров, полисульфонамидов, поликарбонатов, липидов (рис. 19, в). В последние годы стали ясны преимущества метода, в частности, в приложении к культивированию клеток растений и животных, в том числе гибридом — продуцентов моноклональных антител. С этим методом связывают надежды на повышение эффективности синтеза ценных препаратов пищевого и медицинского назначения культурами растительных и животных клеток.

На примере животных клеток рассмотрим технологию инкапсулирования (Е. G. Posillico, 1986). Клетки включают в альгинатные капли, дающие сферические гранулы при действии Ca^{2+} . Эти гранулы одевают полупроницаемыми мембранами. Затем хелирующим агентом удаляют Ca^{2+} . Полимерная структура альгината рассыпается на мономеры, диффундирующие через мембрану во внешний раствор. Клетки, подобно мальчикам в оболочке икринки, приобретают свободу движения в пределах капсулы, что способствует их росту и доступу к ним питательных веществ. Размеры пор в мембранах устанавливают с таким расчетом, чтобы в капсулах задерживался целевой продукт, а более низкомолекулярные примеси легко из них вымывались. Если речь идет о гибридомных клетках, синтезирующих иммуноглобулины IgG, то поры задерживают этот белок (молекулярная масса 150 кД). Для клеток — продуцентов иммуноглобулинов IgM — изготавливают более крупнопористые капсулы, так как молекулярная масса IgM составляет 900 кД. По окончании процесса, после тщательной отмывки от низкомолекулярных примесей, капсулы разрушают в гомогенизаторе и отделяют центрифугированием от раствора, содержащего концентрированный, легко очищаемый целевой продукт (Е. G. Posillico, 1986).

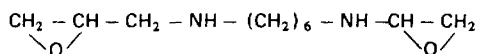
Представляют интерес разработки по использованию липидных мембранных везикул в качестве капсул для ферментов, целых клеток и их органелл (см. гл. 1, § 3). Ферменты, завернутые в липидные мембраны, могут служить температурными реле. При определенной температуре мембраны «плавятся» — слагающие их липиды приобретают текучесть. Плавление ведет к скачкообразному изменению проницаемости мембран и открывает возможность создания биокаталитических систем, действующих на субстрат лишь в определенном диапазоне температур. Так была инкапсулирована уреазы. При 42°C мембраны липосом претерпевают фазовый переход, что ведет к резкому возрастанию активности фермента по отношению к субстрату (мочевине), находящемуся вне капсулы (S. Shui et al., 1983).

Для иммобилизации используют также полые волокна. Их

изготавливают из целлюлозы и ее производных, а также других природных и синтетических полимеров. Раствор, содержащий биокатализатор, вводят во внутренний губчатый объем полого волокна, и далее волокно «запечатывают» с обоих концов. В полости волокна биокатализатор не подвергается химической модификации и сохраняет свои свойства. При этом катализатор легко отделяется от раствора субстрата (продукта).

К методу инкапсулирования биокатализаторов близок метод обращенных мицелл, применяемый для катализа реакций в неводной (органической) фазе. Фермент включают в обращенную мицеллу — замкнутую структуру из поверхностно-активного вещества (детергент, липид), содержащую микроскопическую каплю воды. Функционирование такого фермента протекает на границе раздела двух фаз — органической, заполняющей объем биореактора, и водной, заключенной в обращенную мицеллу (К. Мартинек, 1984).

Иммобилизация путем поперечных сшивок. Метод поперечных сшивок заключается в химическом связывании ферментных молекул или клеток между собой с формированием конгломератов (рис. 19, г). Применяют би- или полифункциональные агенты, несущие две или более реакционноспособные группы и образующие сшивки между молекулами белков и других биополимеров. Примером полифункционального агента служат эпоксиполиимины (J. Ну, 1986):



Подобные соединения осуществляют поперечную сшивку биокатализаторов за счет эпокси- и иминогрупп. Широко используют также глутаровый альдегид, 2,4-толуолдиизоцианат, гексаметилендиизоцианат, хлорпроизводные триазина и т. д. Достоинство метода — относительная простота его реализации, при освоении нового биокатализатора из всех методов он нередко применяется первым.

В сшивках участвуют функциональные группы биокатализаторов, что часто ведет к нарушению их структуры и снижению активности. Иммобилизация клеток путем поперечных сшивок обычно связана с утратой их жизнеспособности. Глутаровый альдегид или другой низкомолекулярный агент проникает внутрь клеток, образуя многочисленные сшивки между внутриклеточными органеллами, ферментными молекулами и т. д. Убивая клетку, такая обработка в то же время стабилизирует конформацию внутриклеточных ферментов, предотвращает атаку на них протеаз, препятствует автолизу клеток. В некоторых случаях ограничиваются иммобилизацией ферментов в клетке, т. е. проводят фиксацию поперечными сшивками клеточного содержимого, без сшивания клеток между собой. Такая обработка может приводить к значительному возрастанию активности клеток как биокатализаторов.

тализаторов, например β -галактозидазной активности клеток *E. coli* (V. Vojtisek, V. Jirku, 1984).

Особое значение имеет поперечная сшивка между клетками и изолированными ферментами, а также между различными видами клеток или несколькими разными ферментами. В этих случаях речь идет о соиммобилизации биокаталитических систем (см. гл. 4, § 3, 4).

Таковы основные методы иммобилизации. Для каждого типа биокатализаторов есть свои предпочтительные методы. Клетки и их органеллы чаще всего иммобилизуют включением в полимерные структуры, в то время как изолированные ферменты предпочтительно иммобилизуют на поверхности носителей или методом поперечной сшивки.

Применяются также комбинации различных методов. Так, поперечную сшивку применяют для дополнительной фиксации биокатализаторов, иммобилизованных на носителях или в структуре полимера. В другом варианте методики в «строящийся полимер» вносят биокатализатор (например, клетки), предварительно обработанный сшивающим агентом. В некоторых случаях целесообразно укрепить поверхность альгинатных (карагинановых) гранул с иммобилизованными биокатализаторами, обработав их глутаровым альдегидом или иным сшивающим агентом. В результате гелевые частицы приобретают прочный наружный скелет. Возможно также комбинирование иммобилизации на носителе и инкапсулирования: биокатализатор, прикрепленный к носителю, покрывают капсулой.

Оригинальную комбинацию методов иммобилизации представляет собой способ, предложенный В. Д. Соколовским и Г. А. Коваленко (1984) для окислительно-восстановительных ферментов. Раствор фермента смешивают с золем кремниевой кислоты и смесь наносят на пористый носитель — оксид алюминия. В этих условиях золь кремниевой кислоты за 1—2 мин переходит в гель, так что фермент оказывается одновременно включенным в гелевую структуру и адсорбированным на носителе.

§ 2. Реакторы для процессов с применением иммобилизованных биокатализаторов

Как уже отмечалось, иммобилизованные биокаталитические системы функционируют в биореакторе в виде неподвижной фазы, через которую протекает среда с субстратом, подлежащим биоконверсии. Возможны различные инженерные решения для подобного проточного биореактора. Наряду с непрерывным в таких реакторах используют и периодический режим. Аппараты для иммобилизованных биокатализаторов имеют аналогию с аппаратами для химических процессов с гетерогенным катализом.

Если иммобилизованные катализаторы имеют вид гранул, то важной задачей является их максимально плотная упаковка в

аппарате. Таким путем реализуют еще одно преимущество метода — возможность повышения концентрации биообъекта в реакторе, что влечет за собой и более высокий выход целевого продукта. Например, плотность популяции животных клеток *in vitro* не превышает 10^6 на 1 мл среды, тогда как в составе гелевых гранул или капсул достигает 10^8 — 10^9 на 1 мл.

Плотную упаковку реализуют в биореакторе с циркуляционным перемешиванием и насадкой, роль которой играют гранулы с иммобилизованным биокатализатором. Это один из преобладающих типов биореакторов для иммобилизованных биокаталитических систем, используемый, например, для получения спирта с помощью клеток дрожжей или бактерий *Zyotomonas mobilis*. Применение циркуляционных биореакторов с насадкой порождает, однако, серьезные проблемы: 1) недостаточно эффективное перемешивание, что обуславливает формирование нежелательных температурных, концентрационных и pH-градиентов в объеме аппарата (J. A. Gamerra et al., 1986); 2) затруднения с удалением CO_2 и других газообразных продуктов, которые, прокладывая себе путь к верхней части аппарата, разрушают гранулы с иммобилизованным биокатализатором (A. Johansen, J. M. Flink, 1986).

Для улучшения перемешивания и газообмена биореактор снабжают механической мешалкой, что ощутимо повышает энергозатраты и может быть причиной разрушения гранул. Борьба с повреждающим действием мешалки ведется путем укрепления гранул. Отметим, что мембранные капсулы для животных клеток обладают прочностью, достаточной для сохранения их целостности при работе механической мешалки. Свободные животные клетки при тех же оборотах мешалки подвергаются лизису (E. G. Posillico, 1986).

Предохранение гранул с катализатором от повреждения мешалкой достигается в биореакторе «корзиночного» типа (J. A. Gamerra et al., 1986). Биореактор снабжен мешалкой, которая вращается в полом цилиндре из проволоочной сетки — «корзине». «Корзина» несет в своих ячейках гранулы, содержащие биокатализатор. Получаются два уровня иммобилизации — гранулы с иммобилизованным биокатализатором, которые, в свою очередь, фиксированы в ячейках проволоочной сетки. Проволоочная корзина предохраняет гранулы от разрушения в процессе перемешивания.

Для стимуляции газообмена предложена оригинальная конструкция реактора, в частности для целых клеток, включенных в полимерный гель. Этот гель не оформляют в виде гранул, а еще незастывшим заливают в аппарат, где и происходит гелеобразование. Например, гелеобразование альгината вызывают добавлением Ca^{2+} . Получается монолит геля с иммобилизованным биокатализатором. В этой массе геля прорезают вертикальные каналы для оттока газов. Такие каналы можно изготовить, поместив в биореактор с незастывшим гелем вертикально ориентиро-

ванные стержни (A. Johansen, J. M. Flink, 1986). Подобный биореактор не дает, однако, возможности реализовать принцип потока и поэтому годится лишь для периодического режима работы.

Для биокатализаторов, иммобилизованных в полых волокнах, создан специальный реактор (H. Kitano, N. Ise, 1984). Раствор субстрата протекает через сосуд, рыхло заполненный полыми волокнами, во внутреннем объеме которых содержится биокатализатор. В таком биореакторе достигнута 90%-ная конверсия фумарата аммония в аспарат с помощью клеток *E. coli* (W. J. Smith et al., 1984).

Имеются сообщения о пневматических (эрлифтных, колоночных) биореакторах для иммобилизованных растительных клеток (P. Verlaan et al., 1984).

§ 3. Основные типы иммобилизованных биокаталитических систем

Остановимся на специфике основных типов биокатализаторов. Знание их особенностей, достоинств и недостатков позволяет найти для каждого из них подходящий способ иммобилизации, соответствующую конструкцию биореактора, оптимальную область применения. Известно, насколько многообразны возможности, между которыми приходится выбирать биотехнологу при иммобилизации той или иной биокаталитической системы. Неудивительно, что многие ранние разработки по иммобилизации терпели неудачи, катализаторы теряли активность вследствие неадекватной методики иммобилизации.

Затруднения, связанные с налаживанием новой, пусть перспективной технологии, существенно ограничивают круг промышленных процессов с использованием иммобилизованных биокаталитических систем. Необходимость в иммобилизации отпадает, если свободный биокатализатор, в частности изолированный фермент, достаточно дешев, а процесс уже отлажен. Пример — ферментативный гидролиз крахмала. Выбор свободного или иммобилизованного биокатализатора, таким образом, должен быть подкреплён соображениями экономической целесообразности.

Изолированные ферменты. Первым этапом на пути к получению иммобилизованного фермента служит его выделение из природного источника и очистка. Этот этап часто связан с наибольшими затратами, и даже самая выигрышная стратегия иммобилизации становится непригодной для реализации в промышленном масштабе, если не найден достаточно экономичный способ выделения и очистки соответствующего фермента. Ферментные препараты из микроорганизмов (в том числе генноинженерных штаммов), культур животных, растительных и грибных клеток обходятся дешевле ферментов, выделяемых из тканей крупного

рогатого скота и сельскохозяйственных растительных культур. Последующий этап иммобилизации преследует цель не только создания гетерогенного катализа, но и стабилизации фермента, а в некоторых случаях изменения его специфичности.

Стабилизация фермента при иммобилизации. Включая фермент в ячейки полимерной структуры, подвергая его внутри- и межмолекулярным сшивкам, пришивая его к носителю, закрепляют фермент в рабочей конформации, препятствуя денатурационным перестройкам. Этим объясняется повышение стабильности иммобилизованного фермента при длительном хранении и функционировании, а также по отношению к воздействиям повышенной температуры, экстремальных значений pH, органических растворителей. Уже ди-, три- и тетрамеры ферментов, полученные путем поперечных сшивок молекул, более термостабильны, чем мономеры (G. Talsky et al., 1984).

Если денатурация все-таки происходит, то при подходящих условиях иммобилизованный фермент ренатурирует быстрее растворимого. Рибонуклеаза А после денатурации, вызванной разрывами четырех внутримолекулярных дисульфидных связей при действии дитиотрейтола, самопроизвольно восстанавливает каталитическую активность. Однако для этого необходим довольно длительный лаг-период. В продолжение этого периода молекула принимает различные конформации, пока не отыщет единственный вариант, соответствующий активному ферменту. Ренатурация ускоряется добавлением окислителя, однако лаг-период при этом сохраняется. Рибонуклеаза, иммобилизованная сшивкой на частицах стекла, ренатурирует без лаг-периода при всех испытанных условиях. Предполагается, что иммобилизованный фермент, имея меньшую свободу конформационных перестроек, быстрее свободного находит кратчайший путь к функционально активной конформации (V. G. Janolino et al., 1985).

Возможно, тот факт, что синтезированные в клетке полипептиды быстро принимают рабочую конформацию, объясняется их естественной иммобилизацией на рибосомах (V. G. Janolino et al., 1985).

Иммобилизованные ферменты, как гребцы-невольники на галерах, прикованные каждый к своей скамье, пространственно разобщены на носителе. Это означает резкое затруднение межмолекулярных взаимодействий типа агрегации, которые могут вызвать инактивацию фермента. Если ферменты включены в микропористый носитель, полимерные структуры или микрокапсулы, то они предохраняются также от воздействия микроорганизмов (К. Мартинек, 1984). Это также способствует повышению стабильности иммобилизованных ферментов и позволяет во многих случаях рассматривать иммобилизацию как метод их длительного хранения. Например, α -кетоглутаратдегидрогеназа (V. S. Gomazkova et al., 1985), галактозилтрансфераза (A. G. Demers, S. S. Wong, 1985), амилоглюкозидаза (A. Kumar, H. S. Nainawatee, 1985) сохраняют каталитическую активность

в иммобилизованном состоянии значительно лучше, чем в растворимом состоянии.

Стабилизация биокатализатора достигается при правильном подборе условий и метода иммобилизации. В противном случае может наступить дестабилизация фермента и даже необратимое разрушение его структуры в процессе иммобилизации — причина неудачного исхода многих ранних разработок. В наши дни этого в большинстве случаев удается избежать, но различные способы иммобилизации дают разные по стабильности ферментные препараты. Активность амилаглюкозидазы, включенной в полиакриламидный гель или пришитой с бромцианом к сефарозе 4В, не снижается при хранении в замороженном состоянии в течение месяца (при -14°C). Активность того же фермента, иммобилизованного на сефарозе с помощью карбодиимида, за месячный срок в тех же условиях падает до 25% от первоначальной (А. Kumar, Н. S. Nainawatee, 1985). Перспективно применение комбинации нескольких методов ограничения подвижности ферментных молекул. Например, связывание с водорастворимым полимером с последующим пришиванием к кремниевому носителю дает большую стабильность препарата целлюлазы, чем каждый из этих методов в отдельности (J.-P. Lenders et al., 1985).

Наряду со стабилизацией часто наблюдается определенное снижение активности фермента при иммобилизации. Случаи сохранения активности на первоначальном уровне или дополнительной активации фермента редки (J. Kaš et al., 1984). Это объясняют искажением структуры фермента при иммобилизации и затруднением доступа к нему кофакторов и субстратов, особенно если фермент со всех сторон экранирован носителем.

Изменение функциональных свойств ферментов при иммобилизации. Стабилизация фермента, изменение его активности — это примеры влияния иммобилизации на свойства фермента. Помимо воздействий на структуру и диффузионных ограничений, на характеристики фермента при иммобилизации существенно влияет микроокружение, определяемое природой носителя. Поперечная сшивка молекул химотрипсина гидросукцинимидом ведет к сдвигу его изоэлектрической точки от 8 до 5, уменьшению константы Михаэлиса и изменению других функционально важных параметров (G. Talsky et al., 1984). Подобные модификации могут иметь и положительное, и отрицательное значение в зависимости от поставленной задачи.

Испытывая различные способы иммобилизации, исследователь стремится к сохранению функциональных характеристик фермента или к их целенаправленному изменению. Так, иммобилизацией фермента на анионном или катионном полиэлектролите можно добиться сдвига его оптимума pH, соответственно, в щелочную или кислую сторону (К. Мартинек, 1984). Положительное значение имеет расширение оптимальной зоны pH сахарофосфорилазы *Leuconostoc mesenteroides* при ее иммобили-

зации в желатине с последующей сшивкой глутаровым альдегидом (E. J. Vandamme et al., 1984).

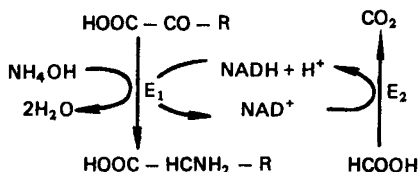
Иммобилизация приводит к снижению эффективности ингибиторов ферментов. Одной из причин здесь, по-видимому, является затрудненный доступ ингибиторов к иммобилизованному ферменту. Это подтверждается тем, что ингибирующее действие высокомолекулярных соединений снижается в большей степени, чем низкомолекулярных. Иммобилизованный трипсин сохраняет чувствительность к низкомолекулярному ингибитору фенилметансульфонилфториду, но не к ингибитору из сои с молекулярной массой 22 кД или овомукоиду с массой 33 кД (J. Kas et al., 1984).

В то же время известны случаи, когда иммобилизация повышает устойчивость ферментов и к низкомолекулярным ингибиторам. Иммобилизация *L*-аланинаминотрансферазы на коллагеновой мембране ведет к снижению ингибирующего действия двухвалентных катионов (Gzia et al., 1984).

Важное практическое значение иммобилизации заключается в том, что ферментам можно придать способность функционировать в неводной среде, в частности в органических растворителях. Строго говоря, речь идет о двухфазных системах, так как носитель фермента удерживает в себе воду и именно этим водным микроокружением обусловлено сохранение каталитической активности.

Проблема регенерации кофакторов. Одностадийные реакции, не требующие кофакторов (получение *L*-аминокислот из рацематов, превращение глюкозы во фруктозу, гидролиз лактозы и т. д.), относят к ферментативным биотехнологическим процессам первого поколения. Некоторые из них ныне применяют в промышленном масштабе.

Переход к процессам второго поколения связан с освоением более сложных, в том числе многостадийных процессов, которые зависят от растворимых кофакторов, включая АТФ, NAD (P), флавины. Примером служит получение *L*-аминокислот из кетокислот:



Реакция зависит от NADH, пополнение фонда которого достигается окислением формиата до CO_2 . Здесь E_1 и E_2 — соответственно дегидрогеназы кетокислот и формиата.

NADH и другие растворимые кофакторы уносятся током жидкости в проточном непрерывно действующем биореакторе с иммобилизованными ферментами, а постоянное добавление

новых порций кофакторов крайне неэкономично. В то же время простая иммобилизация кофактора недопустима, так как он должен совершать челночные движения между несколькими ферментами (в приведенном примере — между двумя дегидрогеназами) и, следовательно, обладать определенной степенью подвижности.

Возможны два подхода к решению проблемы регенерации кофактора.

1. Кофактор может быть пришит к ферменту или его носителю через пространственную ножку: достаточно длинную и гибкую для челночных движений кофактора. Подобные препараты дороги и недостаточно эффективны (W. Hartmeier, 1985)

2. Масса молекулы кофактора может быть значительно увеличена за счет присоединения к водорастворимым полимерам — декстрану, полиэтиленгликолю. Такой «разбухший» кофактор сравнительно легко удерживается в биореакторе, если на пути оттока жидкости из аппарата поставить ультрафильтр. Этот подход более перспективен и использован во многих биотехнологических разработках.

Иммобилизованные клетки. Определенная переориентация с иммобилизованных ферментов на иммобилизованные клетки, наблюдаемая в настоящее время, связана с тем, что: а) при использовании целых клеток не требуется проводить отделения и очистки фермента; б) клетки осуществляют как одно-, так и многостадийные процессы, имея необходимые для этого кофакторы. Конечно, метод иммобилизованных ферментов не имеет альтернативы, если речь идет о внеклеточных (экскретируемых) ферментах, например о целлюлозах.

В промышленных масштабах часто используют иммобилизованные убитые клетки, способные обычно лишь к одностадийным процессам. Такие клетки служат эквивалентом инкапсулированного фермента. Остальное клеточное содержимое — ненужный балласт, нередко представляющий угрозу для целевого фермента. Протеазы, способные инактивировать целевой фермент, и другие агенты, которые могут вызвать нежелательные химические реакции, стремятся тем или иным способом удалить из клетки (например, путем вымывания), инактивировать или вывести из сферы действия внутриклеточными сшивками.

Иммобилизация и рост клеток. Живые клетки более перспективны и в то же время являются более «капризными» биокатализаторами, чем неживые клетки. Однако непостоянство свойств клеток, варьирующих от популяции к популяции, от одной стадии развития к другой, накладывает отпечаток на устойчивость их работы как биокатализаторов.

Иммобилизация в ряде случаев приостанавливает развитие клеток, что способствует стабилизации их каталитической активности. Но так происходит не всегда. От условий и метода иммобилизации, подготовки биообъекта к этой процедуре, предыстории культуры клеток, состава питательной среды, фазы роста

зависит, будет ли исследователь иметь дело после иммобилизации с покоящимися или растущими и делящимися клетками. Покоящиеся клетки выигрывают делящихся. При делении клетки могут покидать носитель, если применен метод иммобилизации на носителе. Освободившиеся клетки угрожают свести на нет технологические преимущества метода иммобилизации, вызывая порчу целевого продукта. Рост клеток может привести к растрескиванию геля, к разрушению иммобилизующих капсул. Иное дело, когда продуктом служит клеточная масса. В этом случае освободившиеся дочерние клетки уносятся из биореактора в аппарат для сепарации, а материнские продолжают делиться в иммобилизованном состоянии.

Многие ценные продукты не синтезируются растущими клетками. Их синтез наблюдается лишь в стационарной фазе развития культуры (см. гл. 2, § 6), в которой и следует поддерживать иммобилизованные клетки. В частности, в растительных клетках — продуцентах витаминов, пигментов и лекарственных соединений — наблюдается взаимное ингибирование роста и синтеза целевого продукта (O. Sahai, M. Knuth, 1985).

Изложенные факты свидетельствуют в пользу применения покоящихся клеток. Для их получения разрабатываются различные методические подходы. В приложении к клеткам растений, рост и деление которых зависит от фитогормонов, практикуется поддержание иммобилизованной клеточной популяции в отсутствие гормонов. Этим также достигается и более полное выражение генетического потенциала клеток в отношении синтеза целевого продукта. Так, иммобилизованные клетки растения *Morinda citrifolia* синтезируют в 10 раз больше антрахинона, чем свободные клетки того же растения (O. Sahai, M. Knuth, 1985). Для подавления роста иммобилизованных бактериальных клеток-продуцентов применяют антибиотики (S. Birnbaum et al., 1984).

В то же время существует подход, основанный на использовании растущих иммобилизованных клеток. Синтез некоторых продуктов происходит в условиях роста клеток и подавляется при его прекращении.

Повышение проницаемости и стабильности иммобилизованных клеток. Иммобилизация клеток зачастую дополняется системой мер, направленных на повышение проницаемости клеточной стенки (пермеабиллизация). В результате пермеабиллизации клетки выделяют в культуральную жидкость максимальное количество целевого продукта, а не накапливают его внутриклеточно. К числу ценных веществ со внутриклеточной локализацией относятся многие генноинженерные продукты, производимые бактериальными клетками, а также метаболиты растительных клеток, культивируемых *in vitro*. Пермеабиллизация способствует использованию прогрессивных технологий, основанных на принципе потока.

Иммобилизация сама по себе может повышать проницаемость клеточной стенки, мембраны. Однако нередко требуется допол-

нительная обработка клеток органическими растворителями, изменением pH и другими путями. В рассмотренном примере с *M. citrifolia* дополнительное повышение выхода антрахинона достигается обработкой клеток диметилсульфоксидом. Добавление фитогормонов к растительным клеткам и индукция формирования корней в культуре тканей может также вести к повышению проницаемости. Радикальным воздействием является удаление клеточной стенки, т. е. использование иммобилизованных протопластов.

Таким образом, иммобилизованные клетки — сложные каталитические системы, имеющие более разнообразные возможности, чем изолированные ферменты. Проблемы при реализации «биотехнологического потенциала» иммобилизованных клеток связаны с достижением стабильного выхода продукта и его выведением из клетки в омывающий раствор.

Важным подходом к стабилизации каталитической активности служит периодическое перенесение клеток в составе гранул или частиц других типов в богатую питательную среду. Кратковременная смена условий питания значительно увеличивает активность и сроки функционирования клеток как биокатализаторов. Так, 3-кетостероид- Δ' -дегидрогеназная активность иммобилизованных клеток *Arthrobacter globiformis*, проявляющаяся на минимальной среде, возрастает в шесть раз после инкубации в богатой питательной среде (Г. К. Скрябин, К. А. Кошеченко, 1984). В то же время это еще один способ минимизировать рост и деление клеток в процессе их работы.

В ряде биотехнологических разработок иммобилизации подвергают грибные споры. В полноценной питательной среде иммобилизованные споры *Curvularia lunata* прорастают. «Заякоренный» грибной мицелий затем применяют для 11 α -гидроксилирования стероидов. Для гидроксилирования в 11 β -положении непосредственно используют иммобилизованные споры другого плесневого гриба, *Aspergillus ochraceus*. Лучшим для иммобилизации грибных спор оказался метод включения в структуру полиакриламидного геля (V. Bihari et al., 1984).

Клеточные органеллы. Изолированные клеточные органеллы (хлоропласты, митохондрии, микросомы, лизосомы, пероксисомы и др.) как объекты биотехнологии содержат ферменты или полиферментные комплексы и в то же время свободны от большинства других компонентов клетки. Выделение органеллы или группы органелл обычно представляет собой более простую процедуру, чем получение очищенного фермента. В отличие от клеток, изолированные органеллы не растут и не делятся. Хлоропласты и митохондрии, обладая собственной ДНК, размножаются в составе целой клетки, но не *in vitro*.

Если фотосинтетическая активность клеток пурпурных бактерий меняется от одной фазы развития культуры к другой, то активность выделенных из этих бактерий фотосинтетических мембран (хроматофоров) длительно поддерживается на постоянном

уровне, пока не произойдет инактивация. Изолированные и включенные в полиакриламидный гель хроматофоры *Rhodospirillum rubrum* используют в лабораторных масштабах для синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет световой энергии. Правда, АТФ-синтетазная активность иммобилизованных хроматофоров снижается при длительном освещении (H. S. Yang et al., 1976).

Архебактерия *Halobacterium halobium*, обитатель Мертвого моря и других засоленных водоемов, при росте на свету образует бактериородопсин — белок, содержащий пигмент ретиналь и придающий мембранам клеток пурпурную окраску. Этот белок отвечает за преобразование световой энергии в энергию разности электрических потенциалов и концентрационного градиента ионов H^+ на цитоплазматической мембране. Выделенные из клеток *H. halobium* пурпурные мембраны предлагают иммобилизовать на различных носителях с целью создания искусственных фотоэлектрических преобразователей — биотехнологических аналогов солнечных батарей.

Поскольку электрические свойства бактериородопсина обусловлены его активностью как светозависимой помпы для ионов H^+ , носитель должен быть проницаемым для H^+ , но не для других ионов. Подходящим носителем является липидная бислойная мембрана, которая в целях ее упрочнения может быть армирована, например, путем нанесения на микропористый тефлоновый фильтр.

Соиммобилизация. Под соиммобилизацией понимают совместную иммобилизацию различных биокатализаторов: двух или более ферментов, видов клеток, комбинаций ферментов и клеток и другие варианты. Иммобилизация нескольких ферментов позволяет осуществить многостадийные процессы *in vitro*. Пример — превращение кетокислот в аминокислоты, совмещенное с регенерацией кофактора (см. гл. 4, § 3). Многостадийные процессы могут быть осуществлены также с использованием нескольких видов соиммобилизованных клеток, в частности смешанных культур микроорганизмов. Так, трансформация сорбозы в 2-кето-*L*-гулоновую кислоту, легко переводимую в результате химического окисления в аскорбиновую кислоту, происходит при участии соиммобилизованных клеток *Gluconobacter melanogenes* и *Pseudomonas syringia*.

Большое внимание уделяют соиммобилизации ферментов и клеток. При этом возможны два варианта.

1. Клетки имеют ту же каталитическую активность, что и совместно с ней иммобилизованный фермент. Использование такой системы позволяет значительно ускорить реакцию и стабилизировать каталитическую активность.

2. Клетки и фермент катализируют разные реакции. В этом случае возможно поэтапное преобразование субстрата в целевой продукт.

Важнейшие биотехнологические процессы, реализованные с

Таблица 4. Примеры соиммобилизованных систем, включающих клетки и изолированные ферменты (по В. Dixon, 1984 и W. Hartmeier, 1985)

Компоненты соиммобилизованной системы		Биотехнологический процесс
клетки	ферменты	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zygomonas mobilis</i> То же	β-Глюкозидаза β-Галактозидаза	Сбраживание целлобиозы до этанола Сбраживание лактозы до этанола
<i>S. cerevisiae</i> То же	Глюкоамилаза Пепсин	Получение пива с низким содержанием декстринов Получение вина с низким содержанием белков
»	Глюкозооксидаза	Превращение глюкозы в глюконовую кислоту
<i>Aspergillus niger</i> То же	Каталаза Глюкоамилаза	То же Удаление кислорода из пива

применением систем из соиммобилизованных ферментов и клеток, представлены в табл. 4.

Два широко используемых метода соиммобилизации ферментов и клеток проиллюстрированы на рис. 20. Один из них состоит в том, что смесь раствора фермента и суспензии клеток включают в полимерную структуру (рис. 20, а). Другой метод рассмотрим на примере соиммобилизации клеток гриба *Aspergillus niger*, содержащих глюкозооксидазу и каталазу, с изолированной каталазой. Эту систему используют для окисления глюкозы до глюконовой кислоты. Убитый мицелий *Asp. niger* промывают агентом, увеличивающим проницаемость клеток, сушат и затем погружают в раствор каталазы. Сухой мицелий насасывает воду и, следуя за ее потоками, каталаза плотно садится на регидратированный мицелий. Связь между клеткой и ферментом упрочняют путем поперечной сшивки глутаровым альдегидом (рис. 20, б).

В полученной системе реакция разложения пероксида водорода при участии каталазы эффективно обеспечивает глюкозооксидазную реакцию кислородом. Это позволяет ускорить образование глюконовой кислоты в 10 раз по сравнению с тем же процессом без соиммобилизованной системы. Соиммобилизация *Asp. niger* и β-глюкозидазы препятствует накоплению промежуточного продукта — глюкозы — при сбраживании целлобиозы до этанола и тем самым предотвращает вызываемое глюкозой ингибирование процесса.

При соиммобилизации биокаталитических систем, в частности клеток с ферментами, встает проблема их функциональной совместимости. Например, попытка превратить крахмал во фруктозу с применением соиммобилизованных глюкоамилазы и бактериальных клеток с глюкоизомеразной активностью по схеме:

крахмал $\xrightarrow{\text{глюкоамилаза}}$ глюкоза $\xrightarrow{\text{клетки с глюкоизомеразной активностью}}$ фрукто-

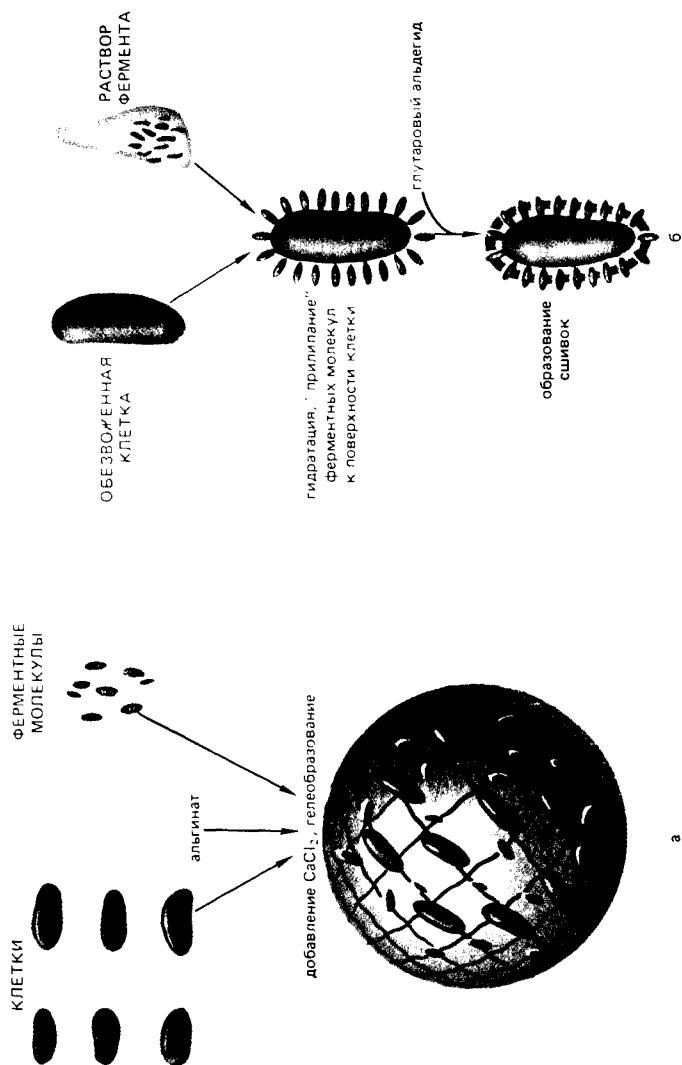


Рис. 20. Схема методов соиммобилизации клеток и изолированных ферментов:
 а — соиммобилизация в альгинатном геле; б — гидратация обезвоженной клетки раствором фермента и их сшивка бифункциональным агентом (по W. Hartmeier, 1985)

Таблица 5. Применение иммобилизованных биокаталитических систем в промышленности (по W. Hartmeier, 1985, и др.)

Тип биокатализатора	Метод иммобилизации	Каталитическая активность	Биотехнологический процесс
Изолированный фермент или мертвые клетки	Иммобилизация в желатиновом геле с дополнительной поперечной сшивкой, в полых волокнах, адсорбция на носителях	Глюкоизомеразная	Получение фруктозы или смеси фруктозы и глюкозы
Изолированный фермент	Адсорбция на ионообменниках	L-Аминоацилазная	Получение L-аминокислот из смесей L- и D-изомеров
Мертвые клетки	Иммобилизация в геле с поперечной сшивкой	L-Аспартазная	Получение L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония
Изолированный фермент или мертвые клетки	Связывание с носителем, включение в гель	Пенициллиназная	Получение из природного бензилпенициллина 6-аминопенициллановой кислоты — основы для производства полусинтетических пенициллинов
Изолированный фермент	Включение в ацетатцеллюлозные нити	Лактазная (β -галактозидазная)	Гидролиз лактозы, получение безлактозного молока
Живые клетки	Включение в каррагинан	Активность всех ферментов, участвующих в биосинтезе яблочной кислоты	Биосинтез яблочной кислоты
Живые клетки	Включение в полиакриламидный гель, крупнопористые носители	3-Кетостероид- Δ' -дегидрогеназная	Трансформация гидрокортизона в преднизолон

за не удастся. Это объясняется несовпадением оптимумов pH для двух биокатализаторов (W. Hartmeier, 1985).

В последние годы усилия направлены на соиммобилизацию клеток растений и их органелл, однако эти препараты недостаточно стабильны для практического использования.

Рассмотренные преимущества иммобилизованных биокатализаторов свидетельствуют о перспективах их практического использования в медицине, пищевой промышленности, органическом синтезе, биоконверсии энергии и даже фотографии. Далеко не все разработки с применением иммобилизованных биокаталитических систем доведены ныне до уровня промышленного применения, многие еще ждут своего часа. Список важнейших биотехнологических процессов на базе иммобилизованных биокатализаторов, внедренных в промышленность, дан в табл. 5.

5

БИОТЕХНОЛОГИЯ НА СЛУЖБЕ НАРОДНОГО ХОЗЯЙСТВА, ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И НАУКИ

Биотехнологические разработки могут внести немаловажный вклад в решение комплексных проблем народного хозяйства, здравоохранения и науки.

Для удовлетворения пищевых потребностей необходимо увеличить эффективность растениеводства и животноводства. Именно на это, в первую очередь, нацелены усилия биотехнологов. Кроме того, биотехнология предлагает как источник кормового (возможно, и пищевого) белка клеточную массу бактерий, грибов и водорослей.

Во-вторых, повышение цен на традиционные источники энергии (нефть, природный газ, уголь) и угроза исчерпания их запасов побудили человечество обратиться к альтернативным путям получения энергии. Биотехнология может дать ценные возобновляемые энергетические источники: спирты, биогенные углеводороды, водород. Эти экологически чистые виды топлива можно получать путем биоконверсии отходов промышленного и сельскохозяйственного производства.

В-третьих, уже в наши дни биотехнология оказывает реальную помощь здравоохранению. Нет сомнений в терапевтической ценности инсулина, гормона роста, интерферонов, факторов свертывания крови и иммунной системы, тромболитических ферментов, изготовленных биотехнологическим путем. Помимо получения лечебных средств, биотехнология позволяет проводить раннюю диагностику инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований на основе применения препаратов антигенов, моноклональных антител, ДНК/РНК-проб. С помощью новых вакцинных препаратов возможно предупреждение инфекционных болезней.

В-четвертых, биотехнология может резко ограничить масштабы загрязнения нашей планеты промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми отходами, токсичными компонентами автомобильных выхлопов и т. д. Современные разработки нацелены

на создание безотходных технологий, на получение легко разрушаемых полимеров (в частности, биогенного происхождения: поли- β -оксибутирата, полиамилозы) и поиск новых активных микроорганизмов-разрушителей полимеров (полиэтилена, полипропилена, полихлорвинила). Усилия биотехнологов направлены также на борьбу с пестицидными загрязнениями — следствием неумеренного и нерационального применения ядохимикатов.

Биотехнологические разработки играют важную роль в добыче и переработке полезных ископаемых, получении различных препаратов и создании новой аппаратуры для аналитических целей.

§ 1. Биотехнология и сельское хозяйство

Биотехнология и растениеводство. Культурные растения страдают от сорняков, грызунов, насекомых-вредителей, нематод, фитопатогенных грибов, бактерий, вирусов, неблагоприятных погодных и климатических условий. Перечисленные факторы наряду с почвенной эрозией и градом значительно снижают урожайность сельскохозяйственных растений. Известно, какие разрушительные последствия в картофелеводстве вызывает колорадский жук, а также гриб *Phytophthora* — возбудитель ранней гнили (фитофтороза) картофеля. Кукуруза подвержена опустошительным «набегам» южной листовой гнили, ущерб от которой в США в 1970 г. был оценен в 1 млрд. долларов.

В последние годы большое внимание уделяют вирусным заболеваниям растений. Наряду с болезнями, оставляющими видимые следы на культурных растениях (мозаичная болезнь табака и хлопчатника, зимняя болезнь томатов), вирусы вызывают скрытые инфекционные процессы, значительно снижающие урожайность сельскохозяйственных культур и ведущие к их вырождению (И. Г. Атабеков, 1984).

Биотехнологические пути защиты растений от рассмотренных вредоносных агентов включают: 1) выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; 2) химические средства борьбы (пестициды) с сорняками (гербициды), грызунами (ратициды), насекомыми (инсектициды), нематодами (нематоциды), фитопатогенными грибами (фунгициды), бактериями, вирусами; 3) биологические средства борьбы с вредителями, использование их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами.

Наряду с защитой растений ставится задача повышения продуктивности сельскохозяйственных культур, их пищевой (кормовой) ценности, задача создания сортов растений, растущих на засоленных почвах, в засушливых и заболоченных районах. Разработки нацелены на повышение энергетической эффективности различных процессов в растительных тканях, начиная от поглощения кванта света и кончая ассимиляцией CO_2 и водно-солевым обменом.

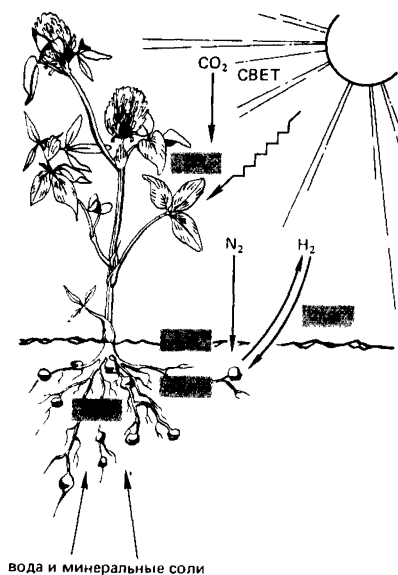


Рис. 21. Гены растений и бактерий — потенциальные объекты приложения генетической инженерии в растениеводстве (по S. T. Lim et al., 1980)

Выведение новых сортов растений. Традиционные подходы к выведению новых сортов растений — это селекция на основе гибридизации, спонтанных и индуцированных мутаций. Методы селекции не столь отдаленного будущего включают генетическую (гл. 1, § 3) и клеточную (гл. 1, § 4) инженерию.

Генетическую инженерию предлагают использовать для выведения азотфиксирующих растений (рис. 21). В природных условиях азотфиксирующие клубеньковые бактерии, представители рода *Rhizobium*, вступают в симбиоз с бобовыми. Комплекс генов азотфиксации (*nif*) из этих или иных бактерий предлагают включить в геном злаковых культур. Трудности связаны с поиском подходящего вектора, поскольку широко используемые для подобных целей *Agrobacterium* с плазмидами *Ti* и *Ri* не заселяют злаки.

Планируют модификацию генома *Agrobacterium*, чтобы бактерия могла вступать в симбиоз со злаками и передавать им генетическую информацию. Другим решением проблемы могла бы быть трансформация растительных протопластов посредством ДНК. К компетенции клеточной инженерии относят создание новых азотфиксирующих симбиотических ассоциаций «растение — микроорганизм» (гл. 1, § 4).

В настоящее время выделены и клонированы гены *sym*, отвечающие за установление симбиотических отношений между клубеньковыми азотфиксаторами и растением-хозяином. Путем переноса этих генов в свободноживущие азотфиксирующие бактерии (*Klebsiella*, *Azotobacter*) представляется возможным заставить их вступить в симбиоз с ценными сельскохозяйственными культурами. Методами генетической инженерии предполагают также повысить уровень обогащения почвы азотом, амплифицируя гены азотфиксации у *Klebsiella* и *Azotobacter*.

Разрабатываются подходы к межвидовому переносу генов *osm*, обуславливающих устойчивость растений к нехватке влаги, жаре, холоду, засоленности почвы. Перспективы повышения эффективности биоконверсии энергии света связаны с модификацией генов, отвечающих за световые и темновые стадии этого процесса, в первую очередь генов *cfx*, регулирующих фиксацию CO_2 растением. В этой связи представляют большой интерес

разработки по межвидовому переносу генов, кодирующих хлорофилл *a/b*-связывающий белок и малую субъединицу рибулозобис-фосфаткарбоксилазы — ключевого фермента в фотосинтетической фиксации CO₂.

Гены устойчивости к некоторым гербицидам, выделенные из бактерий и дрожжей, были успешно перенесены в растения табака (J. Collins et al., 1986). Разведение устойчивых к гербицидам растений открывает возможность их применения для уничтожения сорняков непосредственно на угодьях, занятых сельскохозяйственными культурами. Проблема состоит, однако, в том, что массивные дозы гербицидов могут оказаться вредными для природных экосистем.

Некоторые культурные растения сильно страдают от нематод. Обсуждается проект введения в растения новых генов, обуславливающих биосинтез и выделение нематоцидов корневыми клетками. Важно, чтобы эти нематоциды не проявляли токсичности по отношению к полезной прикорневой микрофлоре. Возможно также создание почвенных ассоциаций «растение — бактерия» или «растение — гриб (микориза)» так, чтобы бактериальный (грибной) компонент ассоциации отвечал за выделение нематоцидов.

Важное место в выведении новых сортов растений занимает метод культивирования растительных клеток *in vitro*. Регенерируемая из таких клеток «молодая поросль» состоит из идентичных по генофонду экземпляров, сохраняющих ценные качества избранного клеточного клона. В Австралии из культивируемых *in vitro* клеточных клонов выращивают красные камедные деревья (австралийские эвкалипты), отличающиеся способностью расти на засоленных почвах. Предполагается, что корни этих растений будут выкачивать воду из таких почв и тем самым понижать уровень грунтовых вод. Это приведет к снижению засоленности поверхностных слоев почвы в результате переноса минеральных солей в более глубокие слои с потоками дождевой воды (S. Prentis, 1984). В Малайзии из клеточного клона получена масличная пальма с повышенной устойчивостью к фитопатогенам и увеличенной способностью к образованию масла (прирост на 20—30%). Клонирование клеток с последующим их скринингом и регенерацией растений из отобранных клонов рассматривают как важный метод сохранения и улучшения древесных пород умеренных широт, в частности хвойных деревьев (Т. М. Powledge, 1984). Растения-регенеранты, выращенные из клеток или тканей меристемы, используют ныне для разведения спаржи, земляники, брюссельской и цветной капусты, гвоздик, папоротников, персиков, ананасов, бананов.

С клонированием клеток связывают надежды на устранение вирусных заболеваний растений. Разработаны методы, позволяющие получать регенеранты из тканей верхушечных почек растений. В дальнейшем среди регенерированных растений проводят отбор особей, выращенных из незараженных клеток, и выбраков-

ку больных растений. Раннее выявление вирусного заболевания, необходимое для подобной выбраковки, может быть осуществлено методами иммунодиагностики, с использованием моноклональных антител или методом ДНК/РНК-проб. Предпосылкой для этого является получение очищенных препаратов соответствующих вирусов или их структурных компонентов (И. Г. Атабеков, 1984).

Клонирование клеток — перспективный метод получения не только новых сортов, но и промышленно важных продуктов. При правильном подборе условий культивирования, в частности при оптимальном соотношении фитогормонов, изолированные клетки более продуктивны, чем целые растения. Иммобилизация растительных клеток или протопластов нередко ведет к повышению их синтетической активности. Табл. 6 включает биотехнологические процессы с использованием культур растительных клеток, наиболее перспективные для промышленного внедрения.

Коммерческое значение в основном имеет промышленное производство шиконина. Применение растительных клеток, которые являются высокоэффективными продуцентами алкалоидов, терпенов, различных пигментов и масел, пищевых ароматических добавок (земляничной, виноградной, ванильной, томатной, сельдереиной, спаржевой) наталкивается на определенные трудности, связанные с дороговизной используемых технологий, низким выходом целевых продуктов, длительностью производственного процесса.

Таким образом, биотехнология открывает широкие перспек-

Таблица 6. Примеры клеточных культур — высокоэффективных продуцентов ценных соединений (по O. Sahai, M. Knuth, 1985, K. Hahlbrock, 1986)

Вид растения	Целевой продукт	Предполагаемое применение
<i>Lithospermum erithrorhizon</i> (воробейник)	Шиконин и его производные	Красный пигмент, используемый в косметике как «биологическая губная помада», антибактериальный агент, используемый при лечении ран, ожогов, геморроя
<i>Nicotiana tabacum</i> (табак)	Убихинон-10	Важный компонент дыхательной и фотосинтетической цепей переноса электронов, применяемый как витамин и в аналитических целях
То же	Глутатион	Участник многих окислительно-восстановительных реакций в клетке, приравнивается к витамину
<i>Morinda citrifolia</i>	Антрахиноны	Сырье для лакокрасочной промышленности
<i>Coleus blumei</i>	Розмариновая кислота	Жаропонижающее средство, проходящее клинические испытания
<i>Berberis stolonifera</i> (барбарис)	Ятрорризин	Спазмолитическое лекарственное средство

тивы в области выведения новых сортов растений, устойчивых к неблагоприятным внешним воздействиям, вредителям, патогенам, не требующих азотных удобрений, отличающихся высокой продуктивностью.

Биодеградация пестицидов. Пестициды обладают мощным, но недостаточно избирательным действием. Так, гербициды, смытаясь дождевыми потоками или почвенными водами на посевные площади, наносят ущерб сельскохозяйственным культурам. Помимо этого, некоторые пестициды длительно сохраняются в почве, что тоже приводит к потерям урожая. Возможны разные подходы к решению проблемы: 1) усовершенствование технологии применения пестицидов, что не входит в компетенцию биотехнологии (см. по этому вопросу К. Н. Велецкий, 1986); 2) выведение растений, устойчивых к пестицидам (см. гл. 5, § 1); 3) биодеградация пестицидов в почве.

К разрушению многих пестицидов способна микрофлора почвы. Методами генетической инженерии сконструированы штаммы микроорганизмов с повышенной эффективностью биодеградации ядохимикатов, в частности штамм *Pseudomonas ceparia*, разрушающий 2, 4, 5-трихлорфеноксиацетат. Устойчивость того или иного пестицида в почве меняется при добавлении его в сочетании с другим пестицидом. Так, устойчивость гербицида хлорпрофама увеличивается при его внесении совместно с инсектицидами из группы метилкарбаматов. Оказалось, что метилкарбаматы ингибируют микробные ферменты, катализирующие гидролиз хлорпрофама (М. А. Питина и др., 1986).

Микробная трансформация пестицидов имеет и обратную сторону. Во-первых, быстрая деградация пестицидов сводит на нет их полезный эффект. Во-вторых, в результате микробного превращения могут образоваться продукты, сильно ядовитые для растений. При использовании гербицида тиобенкарба в Японии наблюдали подавление роста и развития риса. Установлено, что подавляет не сам гербицид, а его дехлорированное производное S-бензил-N,N-диэтилтиокарбамат. Чтобы предотвратить образование такого производного, тиобенкарб применяют в комбинации с метоксифеном, ингибитором дехлорирующего фермента микроорганизмов (М. А. Питина и др., 1986).

Биологическая защита растений от вредителей и патогенов. Из широкого спектра биологических средств защиты растений ограничимся рассмотрением средств борьбы с насекомыми-вредителями и патогенными микроорганизмами. Именно в этих областях имеются наибольшие перспективы.

К традиционным биологическим средствам, направленным против насекомых, принадлежат хищные насекомые. В последние годы арсенал «оружия» инсектицидного действия пополнен грибами, бактериями, вирусами, патогенными для насекомых (энтомопатогенными). Многие виды насекомых-вредителей (тля, колорадский жук, яблоневая плодожорка, озимая совка и др.) вос-

примчивы к заболеванию, вызываемому грибом *Beauveria busiana*. Препарат боверин из лиофильно высушенных конидий гриба сохраняет энтомопатогенность в течение года после обработки почвы или растений. Препарат пецилолин из гриба *Poecilomyces fumoso-roseus* применяют для борьбы с вредителями кустарников, например смородины (О. А. Алешина, 1982).

Важным источником бактериальных энтомопатогенных препаратов служит *Bacillus thuringiensis*. Эти препараты обладают высокой устойчивостью и патогенны для нескольких сотен видов насекомых-вредителей, в том числе для листогрызущих насекомых — вредителей яблонь, винограда, капусты, лесных деревьев. Гены, отвечающие за синтез одного из токсинов *B. thuringiensis*, были изолированы и перенесены в растения табака. Необходимо, чтобы такие «энтомопатогенные» растения не содержали веществ, токсичных для человека и животных (J. Collins et. al., 1986).

Вирусные препараты отличаются высокой специфичностью действия, длительным (до 10—15 лет) сохранением активности, устойчивостью к колебаниям температуры и влажности. Из многих сотен известных энтомопатогенных вирусов наибольшее применение находят вирусы ядерного полиэдроза, обладающие высокой эффективностью действия на насекомых-вредителей. Насекомых выращивают в искусственных условиях, заражают вирусом, из гомогенатов погибших насекомых готовят препараты. Применяют отечественные препараты вирин-ЭКС (против капустной совки), вирин-ЭНШ (против непарного шелкопряда). В последние годы для культивирования вирусов широко применяют культуры клеток насекомых.

Комбинация из нескольких биологических средств нередко действует на вредителей более эффективно, чем каждый в отдельности. Смертность соснового шелкопряда резко возрастает, если вирус цитоплазматического полиэдроза применяют в сочетании с препаратами из *Bac. thuringiensis*. Эффективна комбинация биологических и химических средств защиты растений от насекомых (Л. М. Тарасевич, 1985).

Среди новых средств защиты растений — вещества биогенного происхождения, ингибирующие откладку яиц насекомыми или стимулирующие активность естественных врагов насекомых-вредителей: хищников, паразитов (С. А. Остроумов, 1986).

Разнообразны средства защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов.

1. Антибиотики. Примерами могут служить триходермин и трихотecin, продуцируемые грибами *Trichoderma sp.* и *Trichotecium roseum*. Эти антибиотики используются для борьбы с корневыми гнилями овощных, зерновых и технических культур (О. А. Алешина, 1982).

2. Фитоалексины, естественные растительные агенты, инактивирующие микробных возбудителей заболеваний. Эти соединения, синтезируемые в тканях растений в ответ на внедрение фитопатогенов, могут служить высокоспецифичными замените-

лями пестицидов. Фитоалексин перца успешно применяли при фитофторозе. Могут быть использованы также вещества, стимулирующие синтез фитоалексинов в растительных тканях (С. А. Остроумов, 1986).

3. Использование микробов-антагонистов, вытесняющих патогенный вид и подавляющих его развитие.

4. Иммунизация и вакцинация растений. Вакцинные препараты стремятся вводить непосредственно в прорастающие семена.

5. Введение в ткани растений специфичного агента (*d*-фактора), снижающего жизнеспособность возбудителя (von. G. Zimmermann, 1985).

Биологические средства — важная составная часть комплексной программы защиты растений. Эта программа предусматривает проведение защитных мероприятий агротехнического, биологического и химического плана наряду с использованием устойчивых сортов растений. Задачей комплексной программы является поддержание численности вредителей растений на экологически сбалансированном уровне, не наносящем ощутимого вреда культурным растениям.

Биологические удобрения. Биологические (бактериальные) удобрения применяют для обогащения почвы связанным азотом. Большое распространение получили препараты нитрагин и азотобактерин — клетки клубеньковых бактерий и азотобактера, к которым добавляют стабилизаторы (мелассу, тиомочевину) и наполнитель (бентонит, почву). Азотобактерин обогащает почву не только азотом, но и витаминами и фитогормонами, гиббереллинами и гетероауксинами. Препарат фосфобактерин из *Bacillus megaterium* превращает сложные органические соединения фосфора в простые, легко усвояемые растениями. Фосфобактерин также обогащает почву витаминами и улучшает азотное питание растений.

Растения синтезируют ряд соединений, регулирующих их рост и развитие (фитогормоны, биорегуляторы). К их числу принадлежат ауксины, гиббереллины, цитокинины. Созревание плодов стимулирует этилен. Эти биорегуляторы находят применение в сельском хозяйстве. К числу новых, обнаруженных в последние годы биорегуляторов относят пептиды, имеются перспективы их применения в сельском хозяйстве (K. N. Köhler, 1986).

Биотехнология и животноводство. Большое значение в связи с интенсификацией животноводства отводится профилактике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных с применением рекомбинантных живых вакцин и генноинженерных вакцин-антигенов, ранней диагностике этих заболеваний с помощью моноклональных антител и ДНК/РНК-проб (см. гл. 5, § 3).

Для повышения продуктивности животных нужен полноценный корм. Микробиологическая промышленность выпускает кормовой белок на базе различных микроорганизмов — бактерий,

грибов, дрожжей, водорослей. Богатая белками биомасса одноклеточных организмов с высокой эффективностью усваивается сельскохозяйственными животными. Так, 1 т кормовых дрожжей позволяет получить 0,4—0,6 т свинины, до 1,5 т мяса птиц, 25—30 тыс. яиц и сэкономить 5—7 т зерна (Р. С. Рычков, 1982). Это имеет большое народнохозяйственное значение, поскольку 80% площадей сельскохозяйственных угодий в мире отводятся для производства корма скоту и птице (Г. К. Скрябин, В. К. Ерошин, 1984).

Одноклеточные организмы характеризуются высоким содержанием белка — от 40 до 80% и более. Белок одноклеточных богат лизином, незаменимой аминокислотой, определяющей его кормовую ценность. Добавка биомассы одноклеточных к недостаточным по лизину растительным кормам позволяет приблизить их аминокислотный состав к оптимальному. Недостатком биомассы одноклеточных является нехватка серусодержащих аминокислот, в первую очередь метионина. У одноклеточных его приблизительно вдвое меньше, чем в рыбной муке (О. Volfova, 1984). Этот недостаток присущ и таким традиционным белковым кормам, как соевая мука. Питательная ценность биомассы одноклеточных может быть значительно повышена добавкой синтетического метионина.

Производство кормового белка на основе одноклеточных — процесс, не требующий посевных площадей, не зависящий от климатических и погодных условий. Он может быть осуществлен в непрерывном и автоматизированном режиме.

В нашей стране производится биомасса одноклеточных, в особенности на базе углеводородного сырья. Достигнутые успехи не должны заслонять проблемы, возникающей при использовании углеводородов как субстратов для крупномасштабного производства белка, — ограниченность их ресурсов (Г. К. Скрябин, В. К. Ерошин, 1984). Важнейшими альтернативными субстратами служит метанол, этанол, углеводы растительного происхождения, в перспективе водород.

Очищенный этанол на мировом рынке стоит почти вдвое дороже метанола (О. Volfova, 1984), но этанол отличается очень высокой эффективностью биоконверсии. Из 1 кг этанола можно получить до 880 г дрожжевой массы, а из 1 кг метанола — до 440 г (I. G. Minkevich, 1985). Биомасса из этанола особенно богата лизином — до 7% (О. Volfova, 1984).

Большое значение для животноводства имеет обогащение растительных кормов микробным белком. Для этого широко применяют твердофазные процессы (см. гл. 2, § 6).

Перспективными источниками белка представляются фототрофные микроорганизмы, в особенности цианобактерии рода *Spirulina* и зеленые одноклеточные водоросли из родов *Chlorella* и *Scenedesmus*. Наряду с обычными аппаратами для их выращивания используют искусственные водоемы. Добавление к растительным кормам биомассы *Scenedesmus* позволяет резко повы-

сить эффективность усвоения белков животными (A. Richmond, 1985).

Таким образом, существуют разнообразные источники сырья для получения биомассы одноклеточных. Некоторые субстраты (этанол) дают столь высококачественный белок, что он может быть рекомендован в пищу (см. гл. 5, § 4). Цианобактерии рода *Spirulina* издавна используют в пищу ацтеки в Центральной Америке и племена, обитающие на озере Чад в Африке.

§ 2. Технологическая биоэнергетика

Технологическая биоэнергетика — одно из направлений биотехнологии, связанное с эффективным использованием энергии, запасаемой при фотосинтезе. Это может быть достигнуто путем: 1) превращения биомассы, накопленной в результате фотосинтеза в дешевое и высококалорийное топливо — метан и другие углеводороды, этанол и т. д.; 2) модификации самого процесса фотосинтеза, в результате которой энергия света с максимальной эффективностью используется на образование водорода или другого топлива, минуя стадию фотоассимиляции CO_2 и синтеза компонентов клетки. На уровне теоретических разработок находится идея непосредственного преобразования энергии Солнца в электрическую (биофотоэлектрические преобразователи энергии).

Рассмотрим вначале путь, пролегающий через использование биомассы, в первую очередь, растительной, ресурсы которой в мире огромны и оцениваются в 100 млрд. т по сухому веществу в год. Лишь незначительная часть ее расходуется человечеством, но и эта часть дает до 14% потребляемой в мире энергии. Биомасса — не только возобновляемый и почти даровой источник энергии, но и альтернатива тающим запасам полезных ископаемых.

Получение этанола как топлива. Этанол — экологически чистое топливо, дающее при сгорании CO_2 и H_2O . Он используется в двигателях внутреннего сгорания в чистом виде или как 10—20%-ная добавка к бензину (газохол). В Бразилии уже к 1983 г. 75% автомобилей работали на 95%-ном этаноле, а остальные — на газохоле. В США предполагают заменить на этанол 10% потребляемого бензина. Широкое внедрение этанола планируется в странах Западной Европы.

На значительных посевных площадях намечают выращивать сельскохозяйственные культуры, предназначенные для биотехнологической переработки в этанол. В условиях дефицита посевных площадей возникает проблема, которая уже в наши дни актуальна для Бразилии и выражается дилеммой: продовольствие или энергия. Производство этанола из растительного сырья не является безотходным: на каждый литр спирта при-

ходится 12—14 л сточных вод с высокой концентрацией отходов, опасных для природных экосистем. Проблема рациональной переработки этих отходов не решена.

Классическим биообъектом, используемым при получении спирта, являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи имеют ряд недостатков.

1. Конкуренция брожения и дыхания. Субстрат (например, глюкоза) лишь частично сбраживается до этанола. Оставшаяся часть безвозвратно теряется, превращаясь в результате дыхания в CO_2 и H_2O . Процесс необходимо вести в анаэробных условиях или применять мутанты дрожжей, утратившие митохондрии и не способные к дыханию.

2. Чувствительность к этанолу, которая снижает выход целевого продукта на единицу объема биореактора. Получены устойчивые к этанолу мутанты, характеризующиеся измененным строением клеточных мембран.

3. Отсутствие ферментов, катализирующих расщепление крахмала, целлюлозы, ксилана. Необходим предварительный гидролиз субстрата или засев биореактора смешанной культурой, содержащей, помимо *S. cerevisiae*, микроорганизмы с соответствующей гидролитической активностью.

Бактерия *Zymomonas mobilis*, применявшаяся центрально-американскими индейцами для сбраживания сока агавы, более эффективно сбраживает сахара и более устойчива к этанолу. Дальнейшее повышение устойчивости *Z. mobilis* к этанолу достигается добавлением в среду инкубации Mg^{2+} и ряда нуклеотидных компонентов.

Термофильные бактерии, продуценты этанола характеризуются высокой скоростью роста и метаболизма, чрезвычайно стабильными ферментами, необычной для остальных бактерий устойчивостью к этанолу (до 15% и более). Термофилы способны к биоконверсии полисахаридных субстратов в этанол. Так, *Thermoanaerobium brockii* сбраживает крахмал, *Clostridium thermocellum* — целлюлозу, *Cl. thermohydrosulfuricum* утилизирует продукты деградации целлюлозы с очень высоким выходом спирта. Перспективно применение экстремально термофильного продуцента спирта *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Планируют использование также ацидофильных (оптимум pH 1,5) и галофильных продуцентов спирта.

Повышение выхода спирта и стабилизация активности его продуцентов могут быть достигнуты путем иммобилизации клеток. Так, эффективный синтез этанола осуществлен с применением клеток *Z. mobilis*, иммобилизованных на хлопчатобумажных волокнах (S. Prentis, 1984).

Получение метана и других углеводов. Получение метана — важный путь утилизации сельскохозяйственных отходов. Он получается в виде биогаза — смеси метана и CO_2 . Присутствие CO_2 ограничивает теплотворную способность биогаза как топлива, которая в зависимости от соотношения CH_4/CO_2 состав-

ляет 20,9—33,4 кДж/м³. Содержание метана в биогазе варьирует от 50 до 85%.

Непосредственно к образованию метана способна небольшая группа микроорганизмов, относящихся к архебактериям. Жизнедеятельность метанобразующих архебактерий протекает в строго анаэробных условиях. Субстратами для образования метана могут служить муравьиная и уксусная кислоты, метанол, газовые смеси ($H_2 + CO$, $H_2 + CO_2$). Поскольку биогаз практически получают из сложных органических веществ (целлюлозы, крахмала, белков, липидов, нуклеиновых кислот), то для метанобразования применяют многокомпонентные микробные ассоциации.

Наряду с метанобразующими бактериями в состав таких ассоциаций входят микроорганизмы, переводящие органические субстраты в метанол, муравьиную и уксусную кислоты, H_2 , CO и т. д. Примером может служить метаногенная ассоциация «*Methanobacillus Kuznesceovii*», образующая метан при разложении биомассы водорослей (Чан Динь Тоай, 1984).

Процесс метанобразования отличается высокой эффективностью: до 90—95% используемого углерода переходит в метан. Поэтому метаногенные ассоциации с успехом используют для очистки сточных вод от органических загрязнений с одновременным получением высококалорийного топлива. До 5—10% потребленного углерода превращается в биомассу, которая также находит применение. Используют как жидко-, так и твердофазные процессы получения биогаза (биогазификации).

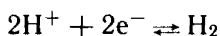
Наряду с биогазом метаногенные ассоциации образуют другие ценные продукты, например витамин B_{12} . После переработки органического субстрата в биогаз остается материал, представляющий собой ценное минеральное (азотное и фосфорное) удобрение.

Получение биогаза — процесс, отличающийся простотой оборудования и доступностью сырья, требует небольших капиталовложений. В Китае, Индии, ряде других стран эксплуатируются небольшие установки, в которые вносят подручный материал (солому, навоз и др.), что исключает затраты на доставку сырья. В Китае действует свыше 7 млн. малых установок вместимостью 10—15 л, достаточных для удовлетворения энергетических потребностей семьи из пяти человек.

Кроме метаногенных анаэробов существует другая группа организмов — продуцентов углеводов как заменителей топлива. Это микроводоросли — *Botryacoeus*, *Isochrysis*, *Nanochloropsis* и др. Углеводы накапливаются в значительных количествах — до 80% сухой массы клеток. В США действует ферма для выращивания водорослей с суммарной площадью водоемов 52 тыс. гектаров, дающая около 4800 м³ жидких углеводов в сутки. Для улучшения топливных характеристик полученные из водорослей углеводороды подвергают гидрированию (Г. Н. Чернов, 1982).

Получение водорода как топлива будущего. Получение водорода как топлива пока остается на уровне поисковых разработок. Это абсолютно чистое топливо, дающее при сгорании лишь H_2O , отличается исключительно высокой теплотворной способностью — 143 кДж/г. Химический и электрохимический способы получения H_2 неэкономичны, поэтому заманчиво использование микроорганизмов, способных выделять водород. Такой способностью обладают аэробные и анаэробные хемотрофные бактерии, пурпурные и зеленые фототрофные бактерии, цианобактерии, различные водоросли и некоторые простейшие (Е. Н. Кондратьева, И. Н. Гоготов, 1981). Процесс протекает с участием гидрогеназы или нитрогеназы.

Гидрогеназа — фермент, содержащий FeS-центры. Она катализирует реакцию



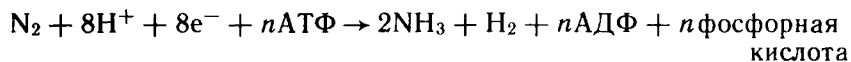
Одна из технологических возможностей основана на включении изолированной гидрогеназы в состав искусственных H_2 -генерирующих систем. Сложной проблемой является нестабильность изолированного фермента и быстрое ингибирование его активности водородом (продуктом реакции) и кислородом. Повышение стабильности гидрогеназы может быть достигнуто ее иммобилизацией (Чан Динь Тоай, 1984; Y. Nosaka et al., 1986). Иммобилизация предотвращает ингибирование гидрогеназы кислородом (Чан Динь Тоай, 1984).

Предложено много вариантов модельных систем, катализирующих образование водорода из воды за счет энергии света. Эти системы различаются механизмом улавливания энергии света и содержат хлоропласты или изолированный из них хлорофилл, а также восстановленные никотинамидные нуклеотиды (Е. Н. Кондратьева, И. Н. Гоготов, 1981). Некоторые системы наряду с водородом образуют кислород: в этом случае речь идет о биофотоллизе воды.

Примером может служить система хлоропласт — ферредоксин — гидрогеназа. Ферредоксин служит промежуточным переносчиком электронов от фотосинтетической цепи хлоропластов к добавленной гидрогеназе. Серьезной проблемой является поддержание низкого парциального давления этих газов, с тем чтобы не наступило ингибирование гидрогеназы. При замене ферредоксина на флавопротеид (L. Thierry et al., 1983) или метилвиологен (А. А. Красновский, 1983) система образует только H_2 . Флавопротеид и, по некоторым данным, метилвиологен защищают гидрогеназу от ингибирования кислородом. Разрабатываются системы с изолированным хлорофиллом, встроенным в детергентные мицеллы или липосомы вместе с гидрогеназой (А. А. Красновский, 1983). Предложена также система с гидрогеназой, иммобилизованной в агарозном геле, с которым прочно связан полимерный виологен и металлопорфирин, аналог хлорофилла (Y. Nosaka et al., 1986).

Водород получают также с применением целых клеток микроорганизмов, стабильность которых возрастает при их иммобилизации. Высокоэффективными продуцентами H_2 являются пурпурные фототрофные бактерии, например *Rhodospseudomonas sp.*, которые при иммобилизации в агарозном геле дают до 180 мкмоль H_2 за 1 ч в пересчете на 1 мг бактериохлорофилла (М. Tadashi, А. Akira, 1983). Важное направление работ — поиск продуцентов H_2 с устойчивой к O_2 гидрогеназой.

Другим ферментом, катализирующим выделение водорода, является нитрогеназа. У всех микроорганизмов нитрогеназа состоит из двух компонентов, а именно из MoFeS-протеида (молибдоферредоксина) и FeS-протеида (азоферредоксина). Основной функцией нитрогеназы является восстановление молекулярного азота:



В отсутствие основного субстрата (N_2) нитрогеназа катализирует энергозависимое восстановление H^+ с образованием H_2 . Переключение фермента с одного режима работы на другой является технологической проблемой. Один из путей решения — получение штаммов микроорганизмов с нитрогеназой, не утилизирующей азот.

В Японии получен штамм *Anabaena sp.*, который осуществляет биофотоллиз воды в режиме, не чувствительном к H_2 , O_2 и N_2 . Повышению эффективности биофотоллиза воды способствует чередование периодов функционирования биообъекта как продуцента H_2 и O_2 с периодами «отдыха», когда клетки фотоассимилируют CO_2 (вводимый на этот период в среду культивирования).

Возможно комбинирование процессов получения H_2 и других ценных продуктов. В частности, представители рода *Clostridium* дают органические растворители и в то же время обладают активной гидрогеназой. Если в реакторе с культурой *Cl. saccharoperbutylacetonicum* не создавать оттока для выделяющегося H_2 , то наблюдается ингибирование образования H_2 и эффективный синтез бутанола, ацетона и этанола. Если водороду обеспечивают свободный отток, то наряду с довольно активным образованием H_2 культура синтезирует лишь этанол (Y. D. Brosseau et al., 1986). Этот пример иллюстрирует возможность управления ходом биотехнологического процесса условиями культивирования биообъекта.

Таким образом, предложены разнообразные проекты систем для получения водорода с использованием биообъектов. Речь идет о вмешательстве человека в процесс биоконверсии энергии с целью добиться ее возможно более полного превращения в энергию химической связи в молекуле H_2 .

Пути повышения эффективности фотосинтетических систем. Рассчитанная теоретически эффективность фотосинтеза, т. е. коэффициент превращения световой энергии в химическую энер-

гию органических веществ, близка к 15% (С. Д. Варфоломеев, Е. С. Панцхава, 1984). Фактически, однако, наиболее продуктивные культурные растения запасают не более 1,5—2% энергии падающего света. Актуальная проблема технологической биоэнергетики — повышение эффективности фотосинтеза у культурных растений.

Разрабатывают следующие основные подходы к решению этой проблемы: 1) повышение коэффициента превращения солнечной энергии до 4—5% за счет увеличения площади листьев и их раннего формирования; 2) вмешательство в системы регуляции фотосинтеза — сбалансированное использование фитогормонов, трансплантация регуляторных генов; 3) увеличение скорости роста растений за счет оптимизации водного и минерального питания, что приведет к повышению их фотосинтетической активности; 4) увеличение числа хлоропластов в клетке на единицу площади листа (М. М. Якубова, 1984); 5) установление оптимального соотношения между функционирующими реакционными центрами хлорофилла и промежуточными переносчиками электронов, например, цитохромами; 6) увеличение скорости переноса электронов между фотосистемами I и II и эффективности сопряжения между транспортом электронов и синтезом АТФ (М. М. Якубова, 1984).

Радикальным способом максимизации эффективности фотосинтеза было бы создание искусственных фотосистем, имитирующих основные блоки фотосинтетического аппарата живых организмов, но внедрение подобных преобразователей энергии, по-видимому, отделено от нас несколькими десятилетиями.

Биотопливные элементы. На уровне поисковых разработок находятся биотопливные элементы, превращающие химическую энергию субстрата в электрическую. Примерами могут служить топливные элементы на основе окисления метанола в муравьиную кислоту с участием алкогольдегидрогеназы, муравьиной кислоты в CO_2 с участием форматдегидрогеназы, глюкозы в глюконовую кислоту с участием глюкозооксидазы. Используют также каталитическую активность целых клеток, например *E. coli*, *Bac. subtilis*, *Ps. aeruginosa*, в реакции окисления глюкозы.

Окисление субстрата происходит на электроде (аноде). Посредником между субстратом и анодом является биокатализатор. Существуют два пути дальнейшей передачи электронов на электрод: 1) с участием медиатора и 2) непосредственный транспорт электронов на электрод (А. И. Ярополов, И. В. Березин, 1985). Конструкция биотопливного элемента позволяет генерировать не только электрический ток, но и осуществлять важные химические превращения. Например, топливный элемент с глюкозооксидазой и β -D-фруктофуранидазой переводит сахарозу в смесь фруктозы и глюконовой кислоты (С. Laane et al., 1984).

Ферментные электроды применяются не только в топливных элементах. Они представляют собой основной компонент биологических датчиков — биосенсоров, широко применяемых в химиче-

ской промышленности, медицине, при контроле за биотехнологическими процессами, в аналитических целях и т. д. Обычно используют системы с биокатализатором, иммобилизованным на поверхности мембранного электрода. Например, иммобилизацией пенициллиназы на обычном рН-электроде получают чувствительный биосенсор, регистрирующий концентрацию пенициллина (S. O. Enfors, N. Cleland, 1983). Иммобилизация клеток *E. coli* на кислородном электроде дает биосенсор для измерения концентрации глутаминовой кислоты, а иммобилизация клеток *Nitrosomonas sp.* и *Nitrobacter sp.* на том же электроде — биосенсор на NH_4^+ (I. Karube et al., 1983). На биосенсоре протекают следующие превращения: $\text{NH}_4^+ \xrightarrow{\text{Nitrosomonas}} \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{Nitrobacter}} \text{NO}_3^-$. Разработаны биосенсоры для быстрой регистрации концентрации глюкозы в крови больного, что особенно важно при диагностике диабета.

§ 3. Биотехнология и медицина

Нет такого экспериментального подхода или исследовательского направления в биотехнологии, которые бы не получили применения в медицине. Вот почему столь многообразны связи между биотехнологией и самой гуманной из всех наук. Здесь мы остановимся лишь на основных моментах.

Антибиотики. Антибиотики — это специфические продукты жизнедеятельности, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов и к злокачественным опухолям, избирательно задерживающих их рост или полностью подавляющих развитие (Н. С. Егоров, 1979). Далеко не все из этих соединений, число которых приближается к 5000, допущены для применения в медицине. К важнейшим антибиотикам терапевтического назначения принадлежат следующие их классы (табл. 7).

Приведенные классы антибиотиков не исчерпывают их многообразия, список их пополняется с каждым годом. Причины неослабевающего внимания к поиску новых антибиотиков, как видно из табл. 10, связаны с токсичностью существующих антибиотиков, аллергическими реакциями, вызываемыми ими, нарастанием устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым препаратам и, помимо этого, с необходимостью изыскания средств борьбы с возбудителями, против которых недостаточно эффективны известные ныне антибиотики. Основные пути поиска включают:

1. Испытание новых продуцентов. Так, с начала 80-х годов исследуют миксобактерии, продуцирующие большое количество антимикробных агентов (Н. Thierbach, N. Reichenbach, 1981).

2. Химическая модификация антибиотиков. Противомикробные макролиды токсичны для человека. Например, гептаен амфотерицин В, используемый по жизненным показаниям при тяжелых микозах, вызывает необратимые поражения почек. Полу-

Т а б л и ц а 7. Важнейшие классы антибиотиков терапевтического назначения (по Н. С. Егорову, 1979; Д.Ланчини, Ф. Паренти, 1985)

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

чены метиловые эфиры амфотерицина, менее токсичные и сохраняющие противогрибковую активность (Д. Ланчини, Ф. Паренти, 1985). При модификации пенициллинов и цефалоспоринов используют иммобилизованные ферменты.

3. Мутасинтез. Применяют мутантные штаммы, у которых блокирован синтез отдельных фрагментов молекулы антибиотика. В среду культивирования вносят аналоги этих фрагментов. Микроорганизм использует эти аналоги для биосинтеза, в результате чего получают модифицированный антибиотик.

4. Клеточная инженерия. Получают гибридные антибиотики, например, с новыми комбинациями агликона и сахаров (С. М. Навашин, Ю. О. Сазыкин, 1984).

5. Генетическая инженерия — введение в геном микроорганизма информации о ферменте, необходимом для модификации продуцируемого антибиотика, например его метилирования при помощи метилаз.

Важной задачей является повышение эффективности биосинтеза известных антибиотиков. Значительных результатов удалось добиться за десятилетия селекции штаммов-продуцентов с применением индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора. Например, продуктивность штаммов *Penicillium* по синтезу пенициллина увеличена в 300—350 раз. Определенные перспективы открываются в связи с возможностью клонирования генов «узких мест» биосинтеза антибиотика или в случае, если все биосинтетические ферменты кодируются единым опероном (см. гл. 6, § 3).

Многообещающим подходом служит инкапсулирование антибиотиков, в частности их включение в липосомы, что позволяет прицельно доставлять препарат только к определенным органам и тканям, повышает его эффективность и снижает побочное действие. Этот подход применим и для других лекарственных препаратов. Например, кала-азар, болезнь, вызываемая лейшманией, поддается лечению препаратами сурьмы. Однако лечебная доза этих препаратов токсична для человека. В составе липосом препараты сурьмы избирательно доставляются к органам, пораженным лейшманией, — селезенке и печени.

Вместо антибиотика в организм человека может вводиться его продуцент, антагонист возбудителя заболевания. Этот подход берет начало с работ И. И. Мечникова о подавлении гнилостной микрофлоры в толстом кишечнике человека посредством молочнокислых бактерий. Важную роль в возникновении кариеса зубов, по-видимому, играет обитающая во рту бактерия *Streptococcus mutans*, которая выделяет кислоты, разрушающие зубную эмаль и дентин. Получен мутант *Strept. mutans*, который при введении в ротовую полость почти не образует коррозивных кислот, вытесняет дикий патогенный штамм и выделяет летальный для него белковый продукт (New Scientist, 1986).

Гормоны. Биотехнология предоставляет медицине новые пути получения ценных гормональных препаратов. Особенно большие

сдвиги произошли в последние годы в направлении синтеза пептидных гормонов.

Раньше гормоны получали из органов и тканей животных и человека (крови доноров, удаленных при операциях органов, трупного материала). Требовалось много материала для получения небольшого количества продукта. Так, человеческий гормон роста (соматотропин) получали из гипофиза человека, каждый гипофиз содержит его не более 4 мг. В то же время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется около 7 мг соматотропина в неделю; курс лечения должен продолжаться несколько лет (S. Prentis, 1984). С применением генноинженерного штамма *E. coli* в настоящее время получают до 100 мг гормона роста на 1 л среды культивирования. Открываются перспективы борьбы не только с карликовостью, но и с низкорослостью — более слабой степенью дефицита соматотропина. Соматотропин способствует заживлению ран и ожогов, наряду с кальцитонином (гормоном щитовидной железы) регулирует обмен Ca^{2+} в костной ткани.

Инсулин, пептидный гормон островков Лангерганса поджелудочной железы, представляет основное средство лечения при сахарном диабете. Эта болезнь вызвана дефицитом инсулина и проявляется повышением уровня глюкозы в крови. До недавнего времени инсулин получали из поджелудочной железы быка и свиньи. Препарат отличался от человеческого инсулина 1—3 аминокислотными заменами, так что возникала угроза аллергических реакций, особенно у детей. Широкомасштабное терапевтическое применение инсулина сдерживалось его высокой стоимостью и ограниченностью ресурсов. Путем химической модификации инсулин из животных удалось сделать неотличимым от человеческого, но это означало дополнительное удорожание продукта.

Компания Eli Lilly с 1982 г. производит генноинженерный инсулин на основе раздельного синтеза *E. coli* его А- и В-цепей. Стоимость продукта значительно снизилась, получаемый инсулин идентичен человеческому. С 1980 г. в печати имеются сообщения о клонировании у *E. coli* гена проинсулина — предшественника гормона, переходящего в зрелую форму при ограниченном протеолизе.

К лечению диабета приложена также технология инкапсулирования: клетки поджелудочной железы в капсуле, введенные однократно в организм больного, продуцируют инсулин в течение года.

Компания Integrated Genetics приступила к выпуску фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Эти пептиды составлены из двух субъединиц. На повестке дня вопрос о промышленном синтезе олигопептидных гормонов нервной системы — энкефалинов, построенных из 5 аминокислотных остатков, и эндорфинов, аналогов морфина. При рациональном применении эти пептиды снимают болевые ощущения, создают хорошее

настроение, повышают работоспособность, концентрируют внимание, улучшают память, приводят в порядок режим сна и бодрствования. Примером успешного применения методов генетической инженерии может служить синтез β -эндорфина по технологии гибридных белков, описанной выше для другого пептидного гормона, соматостатина (см. гл. 1, § 3).

Значителен вклад биотехнологии и в промышленное производство непептидных гормонов, в первую очередь стероидов. Методы микробиологической трансформации позволили резко сократить число этапов химического синтеза кортизона, гормона надпочечников, применяемого для лечения ревматоидного артрита. При производстве стероидных гормонов широко используют иммобилизованные микробные клетки, например *Arthrobacter globiformis*, для синтеза преднизолона из гидрокортизона. Имеются разработки по получению гормона щитовидной железы тироксина из микроводорослей.

Интерфероны, интерлейкины, факторы крови. Интерфероны выделяются клетками человека и животных в ответ на инфицирование вирусами. Они обладают противовирусной активностью. Механизм действия интерферонов до конца не выяснен. Предполагается, в частности, что интерфероны препятствуют проникновению вирусных частиц в клетку. Интерфероны стимулируют деятельность иммунной системы и препятствуют размножению клеток раковых опухолей. Все аспекты действия интерферонов важны с точки зрения их терапевтического применения.

Различают α -, β -, γ - и ϵ -интерфероны, образуемые соответственно лейкоцитами, фибробластами соединительной ткани, Т-лимфоцитами и эпителиальными клетками. Наибольшее значение имеют первые три группы. Интерфероны состоят из 146—166 аминокислотных остатков, β - и γ -интерфероны связаны с остатками сахаров (гликозилированы). До введения методов генетической инженерии интерфероны получали из донорской крови — до 1 мкг неочищенного интерферона из 1 л крови, т. е. примерно одну дозу для инъекции.

В настоящее время α -, β - и γ -интерфероны успешно получают с применением генноинженерных штаммов *E. coli*, дрожжей, культивируемых клеток насекомых (*Drosophila*) и млекопитающих. Генно-инженерные интерфероны могут быть очищены с использованием моноклональных антител. В случае γ - и β -интерферонов предпочтительно применение эукариотических продуцентов, так как прокариоты не гликозилируют белки. Некоторые фирмы, например *Bioferon* (ФРГ), используют не генноинженерные мутанты, а культивируемые *in vitro* фибропласты человека.

Интерфероны используются для лечения болезней, вызываемых вирусами герпеса, бешенства, гепатитов, цитомегаловирусом, вирусом, вызывающим опасное поражение сердца, а также для профилактики вирусных инфекций. Вдыхание аэрозоля интерферонов позволяет предупредить развитие острых респираторных заболеваний. Несколько курьезной проблемой является то,

что интерфероны, в частности α -интерфероны (New Scientist, 1984), сами могут вызывать у пациентов простудные симптомы (насморк, повышение температуры и т. д.). Проблема побочного действия стоит особенно остро при длительном терапевтическом применении интерферонов, необходимом для лечения злокачественных опухолей.

Интерфероны оказывают лечебное воздействие на организм больных раком груди, кожи, гортани, легких, мозга, рассеянной миеломе и саркоме Капоци — два последних заболевания характерны для лиц, страдающих приобретенными иммунодефицитами (см. ниже). Интерфероны полезны также при лечении рассеянного склероза.

Методы генетической инженерии позволяют получать модифицированные интерфероны. Антивирусная активность интерферонов варьирует при аминокислотных заменах (J. Werenne, 1983). Американская компания Cetus Corporation производит β -интерферон, в аминокислотной последовательности которого цистеин в положении 17 замещен на серин. Это приводит к повышению терапевтической активности препарата, так как предотвращает наблюдаемое *in vitro* формирование неактивного димера β -интерферона за счет дисульфидных связей между остатками цистеина в положении 17. Определенные надежды возлагают на модификацию интерферонов путем получения гибридных молекул (Е. Д. Сverdlov, 1984).

Интерлейкины — сравнительно короткие (около 150 аминокислотных остатков) полипептиды, участвующие в организации иммунного ответа (рис. 22). Интерлейкин-1, образующийся определенной группой лейкоцитов крови — макрофагами, в ответ на введение антигена стимулирует размножение (пролиферацию) Т-хелперов (субпопуляции Т-лимфоцитов), продуцирующих, в свою очередь, интерлейкин-2. Последний вызывает пролиферацию различных субпопуляций Т-лимфоцитов — Т-киллеров, Т-хелперов, Т-супрессоров, а также В-лимфоцитов, продуцентов антител. Под влиянием интерлейкина-2 из Т-лимфоцитов высвобождаются регуляторные белки — лимфокины, активирующие звенья иммунной системы; синтезируются также интерфероны.

Интерлейкины, основные лечебные средства при иммунных расстройствах, получают путем клонирования соответствующих генов в *E. coli* или культивирования лимфоцитов *in vitro*. Английская компания Celltech Ltd и японская Sakyō Company предлагают синтезированный генноинженерными бактериями интерлейкин-1 наряду с другим полипептидным агентом — фактором некроза опухолей — для лечения ряда опухолевых заболеваний (B. Sikyta et al., 1986).

Получаемые биотехнологическим путем факторы свертывания крови, особенно фактор VIII (с помощью культивируемых клеток млекопитающих) и фактор IX (с помощью генноинженерного штамма *E. coli*), необходимы для терапии форм гемофилии — наследственной болезни, при которой кровь теряет способ-

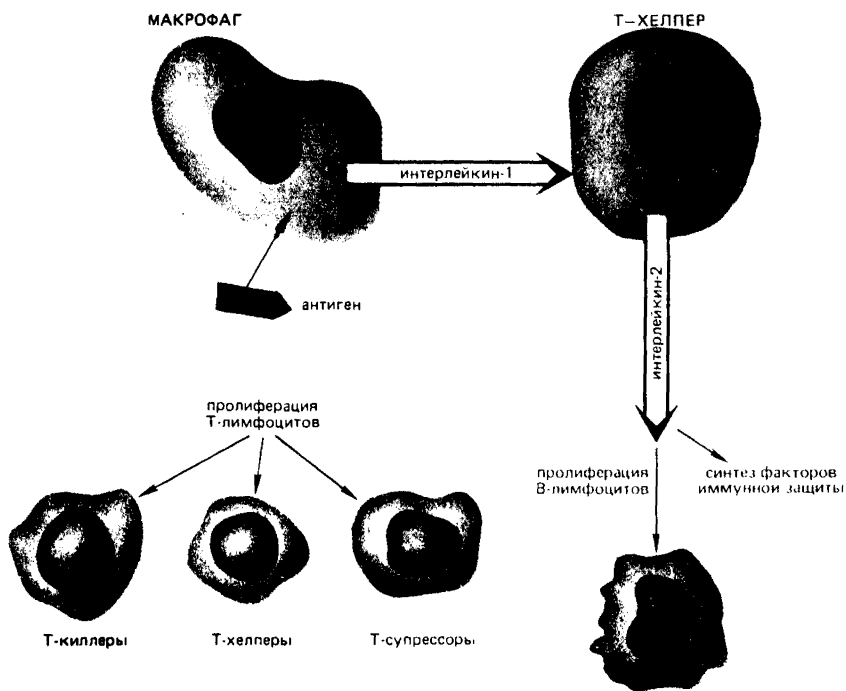


Рис. 22. Роль интерлейкинов в иммунном ответе на антиген (по С. А. Кетлинской и др., 1985)

ность свертываться. К числу ценных с клинической точки зрения факторов, полученных в биореакторах с культурами животных клеток, следует отнести фактор роста В-лимфоцитов, фактор активации макрофагов, Т-заместительный фактор (A. Mizrahi 1986), активатор тканевого плазминогена (B. Sikyta, et al., 1986).

Моноклональные антитела и ДНК-или РНК-пробы. Моноклональные антитела — продукты В-гибридомных клеток (см. гл. 1, § 4) — используют для диагностики различных заболеваний. Обладая высокой специфичностью действия, они обеспечивают идентификацию не только вида возбудителя, но и его серотипа. С помощью моноклональных антител можно тестировать различные гормоны, метаболиты, белковые факторы. Наиболее быстрый метод индикации основан на применении антител, иммобилизованных на мембранных электродах — аналогах ферментных биосенсоров. Они позволяют диагностировать беременность, выявлять предрасположенность к диабету, ревматоидному артриту (J. Collins et al., 1986), идентифицировать наследственные заболевания, сопровождающиеся утратой тех или иных ферментов и других белковых компонентов. Моноклональные антитела широко используют для диагностики рака и определения его форм.

Трудности связаны с тем, что специфических «раковых» антигенов, по-видимому, не бывает, и характерные для злокачественно переродившейся клетки детерминанты могут быть в некоторой, пусть небольшой, вероятностью обнаружены и в здоровых клетках. Перспективна диагностика рака при помощи моноклональных антител к вырабатываемым злокачественной опухолью особым гормонам, аутокринам, ведущим к самостимуляции роста раковых клеток.

Моноклональные антитела имеют не только диагностическое, но и лечебное значение. При аутоиммунных заболеваниях, когда иммунные клетки «оползают» против собственных органов и тканей, моноклональные антитела соответствующей специфичности могут связывать антитела, наносящие вред организму больного. Для лечения рака предлагают использовать моноклональные антитела, конъюгированные с токсичными для раковых клеток соединениями. Моноклональные антитела доставляют яд точно по адресу, избегая поражения здоровых клеток. Поэтому к моноклональным антителам можно присоединять очень сильные токсины, например рицин — яд из клещевины, одной молекулы которого достаточно для поражения одной клетки. В современной фармацевтической промышленности моноклональные антитела используют для очистки лекарственных препаратов.

Диагностическое значение имеют короткие фрагменты ДНК и РНК, несущие радиоактивную или иную метку, так называемые ДНК/РНК-пробы. С их помощью можно установить наличие в организме определенных типов нуклеиновых кислот, соответствующих болезнетворным агентам, злокачественным опухолям, а также проверить геном пациента на наличие у него тех или иных генетических аномалий. Метод основан на комплементарном взаимодействии проб с участками ДНК или РНК, выделенными из исследуемых клеток и фиксированными на носителе. Взаимодействия нуклеотидных цепочек пробы с ДНК(РНК) из образца регистрируют по радиоактивной метке или иным способом.

Моноклональные антитела и ДНК/РНК-пробы используют для диагностики болезней животных и растений. В частности, с помощью этих проб проводят индикацию зараженности картофеля вирусом. Диагностические средства из арсенала биотехнологов предлагают применять для быстрого определения пола у цыплят (Y. Collins et al., 1986).

Рекомбинантные вакцины и вакцины-антигены. Вакцинация — один из основных способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Путем поголовной вакцинации ликвидирована натуральная оспа, резко ограничено распространение бешенства, полиомиелита, желтой лихорадки. На повестке дня — изготовление вакцин против гриппа, гепатитов, герпесов, свинки, кори, острых респираторных заболеваний. Большое экономическое значение имеет разработка вакцин против болезней сельскохозяйственных животных — ящура, африканской болезни лошадей, овечьей бо-

лезни «синего языка», трипаносомозов и др. Традиционные вакцинные препараты изготовляют на основе ослабленных, инактивированных или дезинтегрированных возбудителей болезней.

Современные биотехнологические разработки предусматривают создание рекомбинантных вакцин и вакцин-антигенов. Вакцины обоих типов основаны на генноинженерном подходе.

Для получения *рекомбинантных вакцин* обычно используют хорошо известный вирус коровьей оспы (осповакцины). В его ДНК встраивают чужеродные гены, кодирующие иммуногенные белки различных возбудителей (гемагглютинин вируса гриппа; гликопротеин D вируса герпеса, поверхностный антиген вируса гепатита В, антиген малярийного плазмодия). Получаются вакцины против соответствующих инфекций, хорошо зарекомендовавшие себя в опытах на животных (Е. Paoletti et al., 1986). К их достоинствам относится возможность создания поливалентных вакцинных препаратов на основе объединения участков ДНК различных патогенов «под эгидой» ДНК вируса осповакцины. Открывается возможность одномоментной комплексной иммунизации, скажем, крупного рогатого скота против всех опасных инфекций данной местности (J. Collins et al., 1986).

Вакцины-антигены получают, клонируя гены возбудителя болезни в *E. coli*, дрожжах, клетках насекомых и млекопитающих. Клонирован ген поверхностного антигена НВS-вируса гепатита В (сывороточного гепатита), ген белка оболочки VPI-вируса ящура. Вирус ящура существует в виде многих серотипов, методом белковой инженерии (см. гл. 1, § 3) удалось скомбинировать иммуногенные компоненты различных серотипов в рамках одной вакцины-антигена (J. J. Callis, 1985, M. Winther et al., 1985).

Вакцины-антигены высокостабильны при хранении и перевозке, сравнительно просты в изготовлении (в том числе и при крупномасштабном производстве), содержат минимальное количество белка и поэтому малоопасны как аллергены. Они гарантированы от остаточной инфекционности — способности вызывать инфекционную болезнь вместо того, чтобы предохранять от нее. Проблемой является низкая иммуногенность вакцин-антигенов. Одной из причин может быть то, что вакцина не включает всех компонентов возбудителя, необходимых для создания иммунитета к нему. Так, вирус, покидая клетку, часто «одевается» ее мембраной. Компоненты этой мембраны, отсутствующие в генноинженерном белке, могут обладать иммуногенными свойствами. К повышению иммуногенности вакцин-антигенов ведет добавление адъювантов (J. Collins et al., 1986), иммобилизация вакцин на носителях или их включение в липосомы (И. Г. Харитonenков и др., 1986).

Ферменты медицинского назначения. Многообразно применение ферментных препаратов в медицине. Их используют для растворения тромбов, лечения наследственных заболеваний (вместо отсутствующих эндогенных ферментов), удаления не-

жизнеспособных, денатурированных структур, клеточных и тканевых фрагментов, освобождения организма от токсических веществ (Н. Ф. Казанская и др., 1984). Яркий пример — спасение жизни больных с тромбозом конечностей, легких, коронарных сосудов сердца при помощи тромболитических ферментов (стрептокиназы, урокиназы). В СССР такие препараты созданы в иммобилизованной форме под руководством Е. И. Чазова и И. В. Березина. Ген урокиназы клонирован в бактериях (S. Prentis, 1984). В современной медицине протеазы применяются для очистки очагов гнойно-некротических процессов от патологических продуктов, а также для лечения ожогов. Лечение рака связано с использованием *L*-аспарагиназы, которая лишает раковые клетки ресурсов необходимого для их развития аспарагина, поступающего с током крови. Здоровые клетки в отличие от раковых (некоторых типов) способны к самостоятельному синтезу аспарагина.

Известно около 200 наследственных заболеваний, обусловленных дефицитом какого-либо фермента или иного белкового фактора. В настоящее время делают попытки лечения этих заболеваний с применением ферментов. Так, пытаются лечить болезнь Гоше, при которой организм не способен расщеплять глюкоцереброзиды (S. Prentis, 1984).

В последние годы все больше внимания уделяют ингибиторам ферментов. Ингибиторы протеаз, получаемые из актиномицетов (лейпептин, антипаин, химостатин и др.) и генноинженерных штаммов *E. coli* (эглин) и дрожжей (α -1 антитрипсин), оказываются полезными при септических процессах, инфаркте миокарда, эмфиземе легких, панкреатите (Н. Ф. Казанская и др., 1984; B. Sikyta et al., 1986). Уменьшение концентрации глюкозы в крови больных диабетом может быть достигнуто при использовании ингибиторов кишечных инвертаз и амилаз, отвечающих за превращение крахмала и сахарозы в глюкозу (B. Sikyta et al., 1986). Особой задачей является поиск ингибиторов ферментов, с помощью которых патогенные микроорганизмы разрушают антибиотики, вводимые в организм больного.

Таковы основные направления биотехнологических разработок в области медицины. Без преувеличения можно сказать, что центральное приложение новейших биотехнологических подходов — медицина. Одной из проблем, связанных с белками медицинского назначения, является наличие у них побочных эффектов. Например, аллергические реакции возникают как против генноинженерных белков, так и против моноклональных антител, даже если их получают на основе человеческих гибридом. Эта проблема не нова для медицины и не является непреодолимой.

§ 4. Биотехнология и пищевая промышленность

Микроорганизмы, культуры растительных клеток могут дать пищевые добавки, выгодно отличающиеся своей «натуральностью» от синтетических продуктов, преобладающих в настоящее время. В будущем кулинар сможет добавить в изделие аромат земляники или винограда, масло чеснока или мяты — продукты, образуемые в биореакторах с растительными клетками.

Все большее значение приобретают низкокалорийные, не опасные для больных диабетом заменители сахарозы, в первую очередь фруктоза — продукт превращения глюкозы при участии иммобилизованной глюкоизомеразы. В некоторых продуктах применяют глицин, дающий в комбинации с аспарагиновой кислотой различные оттенки сладкого и кислого. Планируют пищевое применение очень сладкого дипептида аспартама и особенно 100—200-звенных пептидов тауматина и монеллина, которые слаще сахарозы в 10 тыс. раз. В виде мультимера аспартам получен с помощью генноинженерных мутантов *E. coli*, недавно клонирован также ген тауматина (S. Prentis, 1984).

Немаловажную роль играют ныне в пищевой промышленности ферменты. С их помощью осветляют фруктовые соки, производят безлактозное (диетическое) молоко, размягчают мясо. Большие возможности в плане повышения питательной ценности представляет добавление в продукты питания витаминов и аминокислот. Ряд аминокислот производят с применением микробов-сверхпродуцентов, полученных с применением методов генетической инженерии. Так, генноинженерный штамм *E. coli* синтезирует до 30 г/л *L*-треонина за 40 ч культивирования (В. Г. Дебатов, 1982). Важный аспект биотехнологии — улучшение штаммов промышленных микроорганизмов. Основные приложения биотехнологии к пищевой промышленности суммированы в табл. 8.

Биомасса одноклеточных в перспективе может употребляться как пищевая добавка. Основные принципы получения белка в пищу те же, что и для производства кормового белка, однако круг допустимых субстратов более ограничен, а требования к компонентному составу биомассы более жесткие. В пищевой биомассе должно содержаться не менее 80% белка сбалансированного аминокислотного состава, не более 2% нуклеиновых кислот и 1% липидов (М. Г. Безруков, 1985). Необходимы детальные токсикологические и медико-биологические исследования с последующим клиническим испытанием пищевых препаратов биомассы (В. Г. Высоцкий, 1985).

Психологический барьер, на который наталкивается производство «микробной пищи» в странах Европы и Японии, связан не только с прямым риском подвергнуться интоксикации, но и с сомнительными вкусовыми достоинствами этой «пищи будущего». Эксперт по проблемам питания, попробовав образец бактериальной биомассы, заметил: «Она имеет все те свой-

Таблица 8. Перспективы использования биотехнологических продуктов в пищевой промышленности (по П. П. Клесову, 1984; М. Haas, 1984; J. Kas, 1984; O. Volfova, 1984; O. Sahai, M. Knuth, 1985)

Продукт	Примеры	Применение в пищевой промышленности
Аминокислоты	Цистеин, метионин, лизин Глутамат	Повышение питательной ценности пищи (в том числе белка одноклеточных) Усиление аромата мясных, рыбных, грибных изделий
Олигопептиды	Глицин, аспарат Аспартам, тауматин, монеллин	Придание кондитерским изделиям и напиткам кисло-сладкого вкуса Низкокалорийные, очень сладкие вещества
Ферменты	α -Амилаза	Гидролиз крахмала при производстве спирта, вин, в пивоварении, хлебопечении, изготовлении кондитерских изделий и детского питания
	Глюкоамилаза	Получение глюкозы, удаление остаточных декстринов из пива
	Инвертаза	Производство кондитерских изделий
	Пуллулаза	Производство мальтозных (в сочетании с β -амилазой) или глюкозных (в сочетании с глюкоамилазой) сиропов из крахмала, предварительно обработанного α -амилазой
	β -Галактозидаза	Производство безлактозного молока, освобождение молочной сыворотки от лактозы, приготовление мороженого
	Целлюлозы	Приготовление растворимого кофе, морковного джема, улучшение консистенции грибов и овощей, обработка цитрусовых
	Пектиназы	Осветление вин и фруктовых соков, обработка цитрусовых
	Микробные протеазы	Сыроварение, ускорение созревания теста, производство крекеров
	Пепсин, папаин	Осветление пива
	Фицин, трипсин, бромелайн	Ускорение маринования рыбы, удаление мяса с костей
	Липазы	Придание специфического аромата сыру, шоколаду, молочным продуктам, улучшение качества взбитых яичных белков
Витамины	Глюкозооксидаза в сочетании с каталазой А, В ₁ , В ₂ , В ₆ , В ₁₂ , С, D, Е, никотиновая кислота С, Е	Удаление кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонезов, лимонных, апельсиновых и виноградных соков Повышение питательной ценности пищевых продуктов
Терпены и родственные соединения	Гераниол, нерол	Антиоксиданты Ароматизаторы
Органические кислоты	Уксусная, бензойная, молочная, глюконовая, лимонная	Консерванты, ароматизаторы

ства, которыми должна обладать новая человеческая пища: не имеет ни запаха, ни цвета, ни структуры, ни вкуса» (S. Prentis, 1984, с. 138).

Остается выразить надежду на то, что в эпоху, когда белок одноклеточных войдет в употребление, биотехнология сможет в полной мере использовать созданный ею же потенциал растительных и микробных клеток как продуцентов вкусовых, ароматизирующих и структурирующих пищу добавок. Перспективным представляется культивирование грибов (*Fusarium*), цианобактерий (*Spirulina*), зеленых водорослей (*Chlorella*, *Scenedesmus*), имеющих консистенцию и другие органолептические свойства, более привычные для человека. Волокнистую массу *Fusarium* на базе картофельного или пшеничного крахмала как источник пищи для человека производит ныне компания Rank Hovis Mc. Dougall.

§ 5. Биоготехнология

Приложения биотехнологии к добыче, обогащению и переработке руд, отделению и концентрированию металлов из сточных вод как вторичного сырья, экстракции остаточных порций нефти из иссякающих месторождений относятся к области *биоготехнологии*. Большую роль в этих процессах играют микроорганизмы, способные жить в недрах Земли и осуществлять там химические превращения.

Способностью переводить металлы в растворимые соединения (выщелачивание металлов из руд) обладают различные бактерии. Например, *Thiobacillus ferrooxydans* выщелачивает железо, медь, цинк, уран и другие металлы, окисляя их серной кислотой, которая образуется этой бактерией из сульфида (Г. И. Каравайко, 1984). *Chromobacterium violaceum* растворяет золото по схеме $\text{Au} \rightarrow \text{Au}(\text{CN})_2$ (A. D. Smith, R. J. Hunt, 1985). Технологии подобных процессов подкупают своей простотой: для извлечения остатков меди, урана, никеля из «пустых пород» горнорудного производства их обливают водой и собирают вытекающие продукты жизнедеятельности микроорганизмов — растворимые соединения (CuSO_4 , UO_2^{2+} и т. д.). Метод бактериального выщелачивания позволяет рассматривать разработку бедных месторождений как экономически выгодное предприятие. В США бедные никелевые руды, содержащие всего около 1 кг Ni на 1 т породы, предполагают «выдать на гора» с применением бактериального выщелачивания.

Если речь идет об извлечении металлов из сточных вод, то большое значение придается таким микроорганизмам, как *Citrobacter sp.* (L. E. Macaskie, A. C. R. Dean, 1985), *Zoogloea ramigera*, клетки и внеклеточные полисахариды которой извлекают U, Cu, Cd (Г. И. Каравайко, 1984). Велика хелирующая способность грибной биомассы, что, учитывая сравнительную дешевизну ее наработки в больших количествах, открывает

перспективы не только для концентрирования металлов (Pb, Hg, Zn, Cu, Ni, Co, Mn, Cr, Ag, Au, Pt, Pd) из растворов, где они присутствуют в следовых количествах (Г. И. Каравайко, 1984), но и для освобождения растворов от радиоактивных примесей (дезактивации).

Ксантан, внеклеточный полисахарид бактерии *Xanthomonas campestris*, может применяться для извлечения нефти из иссякающих месторождений. Остаточные порции нефти обычно адсорбируются на различных породах, содержащихся в нефтеносных пластах, и не вымываются из них водой. Раствор ксантана в воде обладает, однако, высокой вязкостью и при закачке в пласты под повышенным давлением высвобождает капли нефти из всех трещин и углублений нефтеносных пород (S. Prentis, 1984). Бактерии-деэмульгаторы, например *Nocardia sp*, *Rhodococcus rhodochrous*, разделяют водную и нефтяную фазы, что может быть использовано как для концентрирования нефти, так и для очистки сточных вод от нефтяных примесей, создающих угрозу для окружающей среды (M. A. Wilkinson, D. G. Coore, 1985).

Пересечение различных сфер приложения биотехнологии (в нашем примере — биогеотехнологической и природоохранной) составляет характерную особенность ее современного этапа развития. Генноинженерные штаммы псевдомонад, утилизирующие сырую нефть (см. гл. 1, § 3), допускают, по меньшей мере, две сферы применения: получение биомассы на базе необработанной нефти и предотвращение нефтяного загрязнения окружающей среды, в частности устранения нефтяных пленок на поверхности вод морей и океанов.

Итак, мы подошли к концу нашей книги, где были рассмотрены этапы биотехнологических разработок и их приложения к сельскому хозяйству, энергетике, медицине, пищевой промышленности, горно-рудному делу. Подытожим рассмотренное, охарактеризуем современную биотехнологию в целом.

Нет сомнения, потенциал биотехнологии в наши дни велик. Ей дано — пусть в определенных границах — перевивать поновому «нить жизни» — ДНК — методами генетической и клеточной инженерии, создавать биообъекты по заранее заданным параметрам и, как обычно добавляют, на благо человечества.

Всегда ли на благо? Думается, что уже из основного текста книги ясно: накопленный разносторонний потенциал современной биотехнологии — это обоюдоострый меч, который, подобно другим новым отраслям научно-технического прогресса, сформировавшимся в XX в. (ядерная энергетика, компьютерная электроника, космонавтика), может принести не только пользу, но и вред при бесконтрольном, неосторожном и тем более злонамеренном применении. Так, в распространении методов генетической инженерии видели угрозу заражения людей невиданными болезнетворными «генетическими монстрами», создания новых разновидностей злостных сорняков и даже выведения «стандартных людей» по заранее заданным программам. Потенциальную угрозу, заключающуюся в развитии биотехнологии, нельзя ни преувеличивать, ни преуменьшать, она в значительной мере определяется не чисто научно-техническими, а этическими и социально-политическими факторами. Как отмечено в материалах XXVII съезда КПСС, в разных общественно-политических системах научно-техническая революция оборачивается разными ее гранями и последствиями.

Биотехнология представляется «страной контрастов», сочетания самых передовых достижений научно-технического прогресса с определенным возвратом к прошлому, выражающимся в использовании живой природы как источника полезных для человека продуктов вместо химической индустрии.

Значительные контрасты характерны для биотехнологии и в отношении необходимых для ее развития финансовых средств, сырьевых материалов и кадров. Есть биотехнологические разработки, требующие весьма внушительных капиталовложений, концентрации усилий крупных коллективов научных работников, инженерно-технических и управленческих кадров, дорогостоящего сырья и оборудования (многие генноинженерные разработки, биотехнологические процессы с применением автоматизированных систем управления). Это так называемая «большая

биотехнология». Ей противостоит «малая биотехнология» (получение биогаза, выращивание микроводорослей в прудах), обходящаяся во многом даровыми источниками энергии и сырья, низкими капиталовложениями, небольшими затратами труда.

Все направления современной биотехнологии должны служить всему человечеству, а не только тем, кто способен финансировать развитие той или иной отрасли. В частности, развивающиеся страны должны получить доступ к «большой биотехнологии», которая им пока во многом «не по карману». Генно-инженерная вакцина против малярии необходима для стран Африки, где от малярии погибает более миллиона детей в год. Но могут ли развивающиеся страны Африки финансировать массовое производство генно-инженерных вакцин? Настоятельной необходимостью является международная координация усилий биотехнологов, всех заинтересованных стран. В рамках государств — участников СЭВ такая координация предусмотрена в Комплексной программе научно-технического прогресса, рассчитанной на период до 2000 г.

Биотехнология — междисциплинарная область научно-технического прогресса. Она весьма гетерогенна по своему теоретическому базису, потому что призвана исследовать не какой-либо класс объектов, а решать определенный круг комплексных проблем. Одной из них является, например, поиск дешевого заменителя тростникового (свекловичного) сахара, и армия биотехнологов берется за дело, сочетая в своей деятельности элементы различных наук: методы микробиологии, необходимые для выращивания микроорганизма, биохимии — для выделения глюкоизомеразы (дающей глюкозо-фруктозный сироп при использовании глюкозы как субстрата), органического синтеза — для получения полимерного носителя, а при регулировке параметров системы с иммобилизованным ферментом необходимы физико-химические расчеты. Добавим еще, что для повышения эффективности биосинтеза глюкоизомеразы могут быть использованы методы генетической и клеточной инженерии.

Круг вопросов, к решению которых привлекают биотехнологические разработки, весьма широк. Однако большинство из них прямо или косвенно связано с глобальными проблемами, стоящими перед современной цивилизацией: загрязнение окружающей среды, угроза экологического кризиса; истощение запасов полезных ископаемых, в первую очередь источников энергии, угроза мирового энергетического кризиса; нехватка продовольствия, особенно ошутимая в развивающихся странах.

Слова «биология» и «биотехнология» различаются лишь тем, что в слове «биотехнология» есть вставка «техно». И биология, и биотехнология имеют дело с живыми объектами, но как различны их подходы к живому! Биотехнолог изучает живое не из чисто познавательного интереса, он пытается «заставить» работать живые объекты, производить нужные человеку продукты. «Зачем брать на себя труд изготовления химических соедине-

ний, если микроб может сделать это за нас?», — говорил Дж. Б. С. Холдейн еще в 1929 г., предвосхищая грядущий расцвет биотехнологии. В современной биотехнологии живое рассматривается как средство производства в ряду всех прочих средств; например, при биологической трансформации органических соединений микроорганизмам отводят роль химических реагентов. Не случайна и стандартная для инженерной энзимологии метафора, уподобляющая иммобилизованные биообъекты «закованным в цепи рабам». Биообъект, таким образом, понижают в ранге, переводя из категории самостоятельной целостной живой системы в категорию реагентов, датчиков, реле, компьютерных деталей, прочих орудий модернизированного производства.

Эта тенденция современной биотехнологии имеет не только философское, но и практическое значение. Она порождает чересчур грубый, примитивный, чисто эмпирический подход к такому сложному объекту, как живое, что ведет к его низкоэффективному функционированию в условиях биотехнологического процесса. Не оправдал себя, в частности, лобовой метод оптимизации подобного процесса, оптимизация «грубой силой», проводимый без детальных знаний физиологии используемого организма. Недостаточно надежен в биотехнологии и метод кибернетического моделирования, упрощающий биологический объект до «черного ящика».

Существует и другая тенденция в биотехнологии. Ее приверженцы относятся с «пониманием» к тонкости и слаженности систем регуляции процессов жизнедеятельности в клетке биообъекта. В полушутливой форме эти мысли выражены журналистом и популяризатором биотехнологии Фишлоком в предисловии к книге «Биотехнологический бизнес» (1982): «Микробы намного умнее и способнее микробиологов, генетиков и инженеров». Речь нередко идет о повышении ранга биообъекта в биотехнологии.

Описанные особенности подхода биотехнологии к объекту выделяют ее среди традиционных естественно-научных дисциплин.

Биотехнология — типичное порождение нашего бурного, динамичного XX в. Она открывает новые горизонты перед человеческим разумом. Проблемы биотехнологии чрезвычайно многообразны, начиная от чисто технических (например, снижение каталитической активности ферментов при их иммобилизации) и кончая тонкими интеллектуальными проблемами, связанными с обеднением фундаментальной науки в связи с доминированием чисто проблемно-прикладных разработок.

В условиях социализма открываются широкие перспективы и возможности для использования новых научных исследований и разработок на благо человека и общества.

ЛИТЕРАТУРА

Актуальные проблемы молекулярной, клеточной и клинической иммунологии/Под ред. Г. И. Марчука и Р. В. Петрова//Итоги науки и техники. Серия Иммунология. М., 1983. Т. 12. С. 143.

А. А. Баев. Новые направления биотехнологии//Биотехнология, 1985. № 2. С. 8—17.

Биотехнология//Под ред. А. А. Баева. — М.: Наука, 1984. С. 311.

В. А. Быков, А. Ю. Винаров, В. В. Шерстобитов. Расчет процессов микробиологических производств. — Киев: Техника, 1985. С. 215.

С. Д. Варфоломеев. Конверсия энергии биокаталитическими системами. — М.: Изд-во МГУ, 1981. С. 256.

Генетическая инженерия/Под ред. А. А. Баева//Итоги науки и техники. Серия Молекулярная биология. М., 1980. Т. 12. Ч. II. 302 с.

Н. С. Егоров. Основы учения об антибиотиках. — М.: Высшая школа, 1986. с.

Иммобилизованные ферменты/Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартиника. — М.: Изд-во МГУ, 1976. Т. 1, 2.

Использование биомассы микроорганизмов для пищевых целей/Под ред. В. К. Ерошина. — Пушкино: Научный центр биологических исследований АН СССР, 1985. С. 119.

Журнал Всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева, 1982. Т. 27. Вып. 6. С. 613—698.

Е. Н. Кондратьева, И. Н. Гоготов. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. — М.: Наука, 1981. С. 344.

С. А. Остроумов. Введение в биохимическую экологию. — М.: Изд-во МГУ, 1986. С. 176.

Л. М. Тарасевич. Вирусы насекомых служат человеку. — М.: Наука, 1985. С. 142.

К. Г. Федосеев. Физические основы и аппаратура микробного синтеза биологически активных соединений. — М.: Медицина, 1977. С. 303.

Фрумкин Б. Е. Развитие биотехнологии для сельского хозяйства и сотрудничества стран—членов СЭВ в этой области//Достиж. персп., 1984. № 35. С. 12—15.

Химическая энзимология/Под ред. И. В. Березина, К. Мартиника. — М.: Изд-во МГУ, 1983.

B. Atkinson, F. Mavituna. Biochemical engineering and biotechnology. — Hong Kong, Nature Press, Macmillan Publishers Ltd., 1983. P. 1119.

Biotechnology//A comprehensive treatise/Eds. H. J. Rehm and G. Reed. — Weinheim, Florida, Basel, Verlag Chemie, 1983. V. 1—8.

Biotechnology: potentials and limitations/Ed. S. Silver—Berlin, Heidelberg, New York, Toronto, Springer-Verlag, 1986.

Cell fusion/Eds. D. Everod, J. Whelan. Pitman, London, Ciba Symp. 103, 1984. P. 291.

J. Cherfas. Man-made life. Basil, Blackwell, Oxford, 1982. P. 270.

Comprehensive biotechnology//The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine/Ed. M. Moo-Young. — Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt, Pergamon Press, 1985. V. 1—4.

Genetic engineering of plants//An agricultural perspective. Eds. T. Kosagi et al. — New York, London, Plenum Press, 1982. P. 499.

M. J. Haas. Methods and applications of genetic engineering// Food Technol., 1984, v. 38, P. 69—72.

Handbook of enzyme biotechnology/Ed. A. Wiseman. — Chicester, New York, Ontario, Brisbane, Ellis Horwood Ltd., 1980.

H. Hauptli. Genetically engineered plants: environmental issues// Biotechnology, 1985, V. 3, P. 437—448.

Maximum photosynthetic efficiency: a problem to be resolved// Biotechnol. Bioeng., 1983, V. 25, P. 1915—1922.

Modern biotechnology/Eds. V. Krumphanzl and Z. Rehacek. — Prague, Czechoslovak Academy of Sciences, V. 1, 2, 1984.

S. Prentis. Biotechnology// A new industrial revolution. London, Orbis Publishing House, 1984. P. 192.

Principles of biotechnology/Ed. A. Wiseman. — Surrey Univ. Press, 1983. P. 217.

J. Watson, J. Tooze. The DNA: a documental history of gene cloning San Fransisco, 1981. P. 605.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автоселекция 39
Амплификация генов в составе векторов 29
Ассоциации клеток 38
Аффинная хроматография 87*
- Бактериальные удобрения 8
Белки направленная модификация 7
— человека (инсулин, интерферон, гормон роста) 26
Белковая инженерия 30
Биогаз 133, 152
Биогеотехнология 149, 150
Биокатализаторы иммобилизованные 109—111, 121
— — — основные типы 111
— — — изолированные ферменты 111—115
— — — иммобилизованные клетки 115
Биокаталитические системы иммобилизованные 121
— — — применение в промышленности 121*
- Биоконверсия 124, 130, 131, 132
Биомасса 80
— отделение от культуральной жидкости 80
— — — — — сепарация 80
— — — — — методы 80, 81
- Биообъект(ы) 8, 13, 24, 39, 43, 55, 132, 135, 153
— культивирование 45
— — — основные принципы 45, 46
— — — определение 8
— — — сохранение ценных свойств при масштабировании 42
— — — субстраты при культивировании 46
— — — — — примеры 45, 48*, 49*, 50*
- Биореактор(ы) 14, 39, 43, 44, 52, 55—58, 69, 132, 147
— для газофазного культивирования 77*
— — — процессов с применением им-
- мобилизованных биокатализаторов 109
— — — конструкция 53—58
— — — лабораторные 68, 69
— — — методы стерилизации 66*
— — — непрерывные процессы 72—75
— — — — турбодостатный режим 73
— — — — хеостатный режим 72, 73
— — — опытно-промышленные 68
— — — периодические процессы 70, 71
— — — — культивирование с диализом 72
— — — — — подпиткой 72
— — — — — отъемно-доливочное культивирование 72
— — — — — полунепрерывное культивирование 72, 75
— — — пилотный 68, 70
— — — принципы действия 53—56
— — — масштабирования 53
— — — однородности 53
— — — промышленные 69, 70
— — — система пеногашения 64, 65, 67
— — — стерилизации 65—67
— — — теплообмена 64, 67
— — — типы 58
— — — аппараты с механическим перемешиванием 58, 59
— — — — пневматическим перемешиванием 59—61
— — — — циркуляционным перемешиванием 61—63
- Биосинтетический путь 14*
— — — негативная регуляция продуктом 14*
- Биотехнологические продукты 5, 6, 9, 13, 45, 55, 58, 68, 69, 79, 126, 135, 152
— — — и аппараты 75
— — — — — специализированные типы 75
— — — — — перспективы использования в пищевой промышленности 148*
— — — — — процессы анаэробные 75
— — — — — — — — — газофазные 76, 78

* Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки или таблицы.

- Микробиологические средства защиты растений 8
 Микробная трансформация 127
 Моноклональные антитела 33—35, 126, 129, 146
 Мутагенез индуцированный 14
 — — недостатки метода 14
 Мутанты 13
 — с нарушенной регуляцией 15
 — отбор 13
 Мутации супрессорные 15
 — спонтанные 13
- Объекты биотехнологических разработок 12
 — — — микроорганизмы олиготрофные 12
 — — — — термофильные 12
 — — — — фотосинтезирующие 12
 Организмы-продуценты 23
 — конструирование 23
 — — — проблемы 23—25
 Основные этапы очистки биотехнологических продуктов 79
 Отбор мутантных клеточных клонов 15
 — продуцента 14
 — — целенаправленные методы 14
- Плазмида 8, 19, 25, 26
 — гибридная 28
 — способность к амплификации 19
 — трансплантация генов 8
 Подбор микроорганизмов 9, 11
 — — требования 11
 Продуценты 28
 — методы улучшения 28—30
 — — — амплификация 28
 Протопласты 31
- Растения-регенеранты 38
 Ревертанты 29
 Регенерация растения 15, 125
 Резистентность 14, 15
- Сверхпродуцент 15*, 40
 — получение 15*
 Сверхсинтез 8, 15
 Селективные среды 11
 Селекция 13
 — методы 13, 124
 — на клеточном уровне 15
 — определение 13
 Скрининг 14
 — гибридных клеток 31
 — растения 125
 Слияние клеток 31—33, 36, 37, 39
 — — возможности метода 31
- Современные методы разделения веществ 85
 — — — — изотахофорез 85, 91—93
 — — — — хроматография 85
 — — — — электрофорез 85, 89
 — — — — электрофокусировка 85, 89, 90
 Соиммобилизация 118—123
 — клеток и изолированных ферментов
 — схема методов 120*
 — примеры 119*
 Соматические клетки 30
 — — гибридизация 30, 31
 Сплайсинг 18
- Технологии новые 8, 12
 — — на основе биоконверсии солнечной энергии 12
 Технология гибридная 33
 Трансфекция 22
 Трансплантация 16
- Ферменты 99
 — иммобилизованные 7, 99, 152
 — методы иммобилизации 99, 101, 102*
 — — — адсорбция 101—105
 — — — включение в полимерную структуру 105—107
 — — — инкапсулирование 107, 108
 — — — поперечные сшивки 108, 109
- Хроматография на основе «молекулярных сит» 86*
- Целевой продукт 11, 15, 74, 75, 96, 126*
 — — выделение 79, 82
 — — — путем абсорбции 85
 — — — — осаждения 82, 83
 — — — — экстракции 83, 85
 — — — — концентрирование 93
 — — — — методы 93
 — — — — выпаривания 93—95
 — — — — обратный осмос 93, 94
 — — — — ультрафильтрации 93, 94
 — — методы очистки 87
 — — обезвреживание 95
 — — — методы сушки 95, 96
 — — — пути модификации 96, 97
 — — стабилизация 97, 98
- Чистые культуры 11
- Этапы изотахофореза 93*
 — перекрестного (двумерного) иммуноэлектрофореза 92*

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
Введение	6
Глава 1. Подготовка биологических объектов	9
§ 1. Подбор объектов	9
§ 2. Селекция	13
§ 3. Генетическая инженерия	16
§ 4. Клеточная инженерия	30
§ 5. Популяционная устойчивость биологических объектов	39
Глава 2. Культивирование биологических объектов	45
§ 1. Субстраты для культивирования биообъектов	46
§ 2. Принципы действия и конструкции биореакторов	53
§ 3. Системы перемешивания и аэрации	58
§ 4. Системы теплообмена, пеногашения и стерилизации биореакторов	64
§ 5. Лабораторные, пилотные и промышленные биореакторы: проблемы масштабирования	68
§ 6. Биотехнологические процессы и аппараты периодического и непрерывного действия	70
§ 7. Специализированные типы биотехнологических процессов и аппаратов	75
Глава 3. Отделение, очистка и модификация продуктов	79
§ 1. Отделение биомассы от культуральной жидкости	80
§ 2. Методы разрушения клеток	81
§ 3. Отделение и очистка продуктов	82
§ 4. Концентрирование продукта	93
§ 5. Обезвоживание продукта	95
§ 6. Пути модификации продукта	96
§ 7. Стабилизация продукта	97
Глава 4. Имобилизованные ферменты и биокаталитические системы	99
§ 1. Методы иммобилизации	101
§ 2. Реакторы для процессов с применением иммобилизованных биокатализаторов	109
§ 3. Основные типы иммобилизованных биокаталитических систем	111
Глава 5. Биотехнология на службе народного хозяйства, здравоохранения и науки	122
§ 1. Биотехнология и сельское хозяйство	123
§ 2. Технологическая биоэнергетика	131
§ 3. Биотехнология и медицина	137
§ 4. Биотехнология и пищевая промышленность	147
§ 5. Биогеотехнология	149
Заключение	151
Рекомендуемая литература	154
Предметный указатель	156
	159