

## Занятие семинарского типа № 10

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Получение лекарственных веществ на основе растительных культур тканей

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

В настоящее время известно более  $2 \cdot 10^4$  БАВ, синтезируемых растениями, которые используются человеком, и их количество постоянно увеличивается. Растения всегда служили источником пищи, эфирных масел, красителей и лекарственных средств. Так, мак снотворный (*Papaver somniferum*) является источником болеутоляющего вещества – кодеина, из наперстянки (*Digitalis lanata*) получают дигоксин, тонизирующий сердечную деятельность, из хинного дерева (*Cinchona ledgeriana*) – антималярийное средство «Хининдин». Большой интерес вызвало открытие пиретринов, выделенных из цветков *Chrysanthemum cinerariaefolium*, представляющих собой мощные инсектициды, особая ценность которых заключается в том, что они не вызывают привыкания у насекомых, а также не проявляют кумулятивного токсического эффекта.

Способность интактных растений синтезировать различные БАВ привела к предположению, что тем же свойством будут обладать клетки и ткани этих растений, выращиваемые в стерильных условиях *in vitro*. Для некоторых культур это оказалось справедливым. Однако в отдельных случаях клетки или не проявляли способности к синтезу необходимых веществ, или синтезировали их в минимальных количествах. Понадобилась длительная экспериментальная работа по подбору питательных сред, условий культивирования, исследованию новых штаммов, полученных благодаря генетической гетерогенности каллусных клеток или применению факторов, чтобы добиться серьезных успехов в этой области.

В настоящее время промышленный синтез вторичных метаболитов – очень перспективное направление. Синтез вторичных метаболитов происходит главным образом в суспензионной культуре клеток, в регулируемых условиях, поэтому он не зависит от климатических факторов, от повреждения насекомыми. Культуры выращивают на малых площадях в отличие от больших массивов плантаций с необходимыми растениями. Культуры клеток растений могут синтезировать практически все классы соединений вторичного обмена, причем довольно часто в количествах, в несколько раз превышающих их синтез в целых растениях. Так, выход аймалицина и серпентина в культуре клеток *Catharanthus roseus* составляет 1,3 % сухой массы, а в целом растении – 0,26 %; в культуре клеток *Dioscorea deltoidea* диосгенин синтезируется в количестве 26 мг на 1 г сухой массы, а в клубнях растений его содержания составляет 20 мг на 1 г сухой массы. Кроме того, в культурах клеток может начаться синтез веществ, не характерных для исходного растения, или расширяется набор синтезируемых соединений. В ряде случаев в клеточной культуре образуются вещества, которые синтезировались интактным растением на ювенильной фазе развития, или вещества, содержащиеся в клетках филогенетически более ранних групп растений. Так, в культуре клеток *Papaver bracteatum* содержится сангвирин, характерный для ювенильных растений, и отсутствует тебаин, синтезируемый взрослыми растениями, а в культуре клеток живокости (*Delphinium*) синтезируются  $\Delta^7$ -стерины, присутствующие у архаичных групп растений.

Синтез вторичных соединений может коррелировать с процессом дифференцировки в культуре клеток. Так, в суспензионной культуре *Papaver somniferum* максимальный синтез алкалоидов начинается после того, как в ней дифференцируется достаточно большое количество специализированных клеток млечников, предназначенных для депонирования метаболитов. С другой стороны, культуры клеток табака и моркови синтезируют большое количество никотина и антоцианина соответственно, хотя их клетки

слабо дифференцированы. Не существует и однозначного ответа на вопрос, как связан синтез вторичных метаболитов с ростовыми процессами. У большого числа культур вторичные метаболиты синтезируются и накапливаются в значительных количествах или во время экспоненциальной фазы, когда ростовые процессы особенно активны, или в период стационарной фазы роста культуры клеток, когда прирост клеточной массы прекращается. Однако есть культуры, например культура клеток *Catharanthus roseus*, у которых синтез вторичных метаболитов сопровождает весь период роста.

Важная особенность культивируемой популяции клеток – ее стабильность в отношении синтеза и накопления продуктов вторичного синтеза. Так, в отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН под руководством Р.Г. Бутенко были получены разные штаммы клеток *Dioscorea deltoidea*, в том числе штамм-сверхпродуцент ИФР ДМ-0,5. Все эти штаммы сохраняли стабильность в отношении синтеза фураностаноловых гликозидов около 26 лет. Интересная особенность большинства клеток в культуре состоит в том, что обычно эти клетки не транспортируют синтезируемые метаболиты в питательную среду или другие клетки, хотя некоторые культуры составляют исключение, в частности культура клеток мака, которые депонируют алкалоиды в млечники. Синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках связан с внутриклеточными органеллами, в основном с пластидами и эндоплазматическим ретикуломом. В клетках, не способных к транспорту метаболитов, продукты вторичного синтеза обычно накапливаются в вакуолях и свободном пространстве клеток (табл. 1).

Таблица 1

Внутриклеточная локализация синтеза и накопления вторичных метаболитов  
(по Р.Г. Бутенко, 1999)

Внутриклеточные метаболиты	Синтез	Накопление
Алкалоиды	Пластиды, цитоплазма	Вакуоль, хлоропласты, свободное пространство (СП) клеток
Терпеноиды Монотерпены Тритерпены	Лейкопласты Хлоропласты, лейкопласты	СП клеток Вакуоль, СП клеток, цитоплазма
Фенолы Флавоноиды	Хлоропласты	Вакуоль, хлоропласты, СП клеток
Танины	Вакуоль, пластиды	Пластиды, СП клеток, эндоплазматический ретикулум (ЭПР)
Кумарины Оксикоричные кислоты	Вакуоль, хлоропласты, ЭПР ЭПР, хлоропласты, митохондрии	Вакуоль Вакуоль, СП клеток, хлоропласты
Цианогенные гликозиды	ЭПР	Вакуоль
Глюкозинолаты	ЭПР	Вакуоль
Бетаины	Предположительно цитоплазма	Вакуоль

### 1. Проблемы получения БАВ на основе культур растительных клеток и тканей

Культивирование растительных клеток в больших масштабах было освоено в 1976 г японскими исследователями, которым удалось получить биомассу в объеме 20 м<sup>3</sup>.

Как и в опытах с микроорганизмами, для экстракции ценных БАВ из растительной биомассы клетки необходимо разрушить. Однако процесс накопления растительной биомассы требует значительных экономических затрат по сравнению с накоплением микробной биомассы, потому ученые стремятся избежать разрушения растительных

клеток. Наиболее перспективным решением данной проблемы, как при реализации полного биосинтеза ценных БАВ, так и для их биологических превращений, является иммобилизация растительных клеток внутри пористых полимеров. В целях обеспечения рентабельности такой системы необходимо, чтобы иммобилизованные растительные клетки оставались живыми в течение длительного времени. В частности, экспериментально установлено, что клетки растений могут оставаться живыми в иммобилизованном состоянии в течение нескольких сотен дней. Хотя в данном случае возникает еще одна проблема – извлечение из растительных клеток синтезированных вторичных метаболитов, которые обычно накапливаются в клеточных вакуолях и не выделяются в окружающую среду. По мнению многих специалистов, в настоящее время это основная проблема, осложняющая использование растительных клеток и тканей для крупномасштабного получения ценных БАВ.

Другая проблема, возникающая при получении вторичных метаболитов на основе растительных культур, связана со сложностью получения в достаточном количестве гомогенного растительного материала и стабильных штаммов. Так, для достижения данной цели требуются месяцы или даже годы напряженной работы в зависимости от особенностей используемого вида.

Кроме того, разнообразие биохимических реакций, свойственное культуре растительных клеток, не всегда удается точно воспроизвести, а, следовательно, необходимо поддерживать коллекцию с большим количеством разнообразных штаммов, чтобы не утратить те из них, в которых синтезируется новое ценное соединение.

Еще одна трудность получения ценных БАВ на основе растительных культур заключается в обязательном использовании высокоспецифичных методов скрининга, позволяющих точно идентифицировать все синтезируемые вещества, в том числе и новые соединения, присутствующие в незначительных количествах. Это особенно важно для всех культур тропических растений, биохимия которых изучена слабо. В связи с этим, специализированные коллекции штаммов обеспечили бы не только сохранение генофонда, но и способствовали бы открытию новых ценных БАВ, обладающих терапевтическим действием.

Знания и практический опыт, накопленные в отношении иммобилизации бактериальных клеток и их ферментов, а также особенностей функционирования таких биореакторов, несомненно, внесут весомый вклад в развитие технологии, применяемой для культуры растительных клеток и получения ценных БАВ на их основе.

## **2. Факторы, влияющие на получение вторичных метаболитов на основе культуры растительных клеток и тканей**

Способность растительных культур к накоплению вторичных метаболитов является установленным фактом. На образование вторичных метаболитов в культуре растительных клеток оказывают влияние следующие факторы: происхождение ткани, условия культивирования (питательные среды, способы выращивания, воздействие стрессовых факторов и т.п.), клеточная дифференциация *in vitro* и селекция.

Происхождение ткани. С целью введения в культуру ткани проводят поиск наиболее продуктивных растений, в надежде, что данная способность будет перенесена и в получаемую культуру. Так, культуры клеток *Catharanthus roseus*, полученные из высокоалкалоидных растений, проявили тенденцию к синтезу большего количества алкалоидов, чем культуры, полученные из малопродуктивных растений. Однако экспериментальные данные в этом вопросе довольно противоречивы.

### Условия культивирования

1. Особенности питания. Важнейшим фактором создания эффективной биотехнологической системы является разработка питательной среды, обеспечивающей потребность продуцента в химических компонентах, необходимых для оптимального биосинтеза целевого продукта. Культура растительных тканей характеризуется

гетеротрофным типом питания, поэтому источник углерода (чаще всего сахаразы) вводится в состав питательной среды в готовом виде. Получение автотрофных фотосинтезирующих растительных культур является задачей будущего. В среде, в которой все питательные вещества присутствуют в избыточном количестве, увеличение концентрации сахаразы, как правило, сопровождается пропорциональным увеличением биомассы и высоким выходом ценных БАВ.

Для многих растительных культур разработаны способы двухэтапного их выращивания, заключающиеся в том, что культуры после накопления достаточного количества биомассы на ростовых средах, затем переносятся в продукционные среды, способствующие максимальному синтезу БАВ в биомассе. В таких средах содержится большое количество сахаразы (5–10 %), изменено соотношение аммиачной и нитратной форм азота, снижена концентрация фосфат-ионов, иногда исключены фитогормоны и некоторые витамины.

2. Стрессовые факторы. Образование вторичных метаболитов в растительной культуре может резко возрасти под влиянием стрессовых факторов, к которым относятся продукты жизнедеятельности микроорганизмов, осмотический шок, ионы тяжелых металлов и т.п. Так, вторичные метаболиты некоторых растений являются фитоалексинами, т.е. их синтез в растительной клетке происходит в ответ на действие продуктов жизнедеятельности микроорганизмов для защиты от фитопатогенов. При добавлении к растительной культуре элекситоров (гомогенат из грибного мицелия или другие продукты жизнедеятельности микроорганизмов) возрастает интенсивность синтеза некоторых ценных БАВ. Кроме элекситоров грибного и микробного происхождения биосинтез вторичных метаболитов могут стимулировать и химические вещества. Так, культура клеток *Lithospermum erythrorhizon* после переноса в продукционную среду, содержащую в 30 раз больше сульфата меди, чем ростовая среда, резко усилила синтез шиконина. Это, по-видимому, объясняется тем, что высокая концентрация сульфата меди вызвала стресс, индуцировавший усиленное образование шиконина.

3. Способы выращивания. При увеличении концентрации продукта в клетке выше пороговой, срабатывает эффект обратного ингибирования, вследствие чего дальнейшее накопление вещества прекращается. Это обуславливает низкое содержание искомым веществ в клетках растительной культуры. Для того, чтобы избежать данного эффекта, рядом исследователей предпринимались попытки удалять продукт реакции по мере его синтеза из клетки. Для увеличения проницаемости клеток *Cinchona ledgeriana* в культуре и ускорения выхода внутриклеточных алкалоидов пытались применить диметилсульфоксид (ДМСО). Однако он оказался непригодным для индукции выделения алкалоидов при биотехнологической эксплуатации *Cinchona ledgeriana*. Даже при высокой концентрации ДМСО высвобождение алкалоидов протекало медленно и большинство обработанных мембран не восстанавливалось.

Для некоторых суспензионных культур очень экономичным оказался способ выращивания клеток в виде двухфазной системы, позволяющий повысить выход целевого продукта. Такая культура состоит из водной фазы (питательная среда с растущими клетками) и нетоксичной липофильной фазы (триглицериды или парафины). В результате липофильные вещества, синтезируемые клетками в процессе их роста, переходят в липофильную фазу. Так, корончатогалловая опухолевая суспензионная культура *Matricaria chamomilla* выращена в двухфазной системе, состоящей из водного раствора питательной среды и нетоксичной липофильной фазы (триглицерид миглиол) в течение 22 дней. В результате жирорастворимые продукты, синтезируемые культурой ткани ромашки, накапливались в фазе миглиола в концентрации в 60 раз большей, чем в однофазной системе. Красящий продукт нафтохинон шиконин, продуцируемый суспензионной культурой *Lithospermum erythrorhizon*, не растворяется в воде, но растворяется в некоторых органических растворителях. Данное свойство шиконина использовано при выращивании культуры в двухфазной системе. В качестве

органического растворителя использован гексадекан, растворивший 81 % синтезируемого клетками шиконина. Причем культура прекращала синтез шиконина, если из клеток он не переходил в органический слой.

Клеточная дифференциация *in vitro*. Образование и накопление вторичных метаболитов в растениях – сложный, пространственно организованный процесс, который в той или иной степени включает в транспорт этих веществ на клеточном и субклеточном уровнях. В целом в ряде случаев показано, разграничение мест первичного синтеза и накопления алкалоидов. Эти 2 процесса могут быть локализованы в пределах одно и того же органа или даже одной и той же ткани, но в разных клетках, что свидетельствует об эпигенетическом контроле процесса пространственного разобщения синтеза и накопления конечного продукта. Так, люпиновые алкалоиды синтезируются в зеленых частях растений, а накапливаются в корнях. В культурах тканей растений, также как и в растениях, накопление вторичных метаболитов зачастую тесно связано со степенью тканевой дифференциации. В культурах ткани обычно формируются секреторные каналы, млечники, слизевые клетки, железки или специализированные клетки, в которых накапливаются конечные продукты, т.е. наблюдается процесс разобщения синтеза и накопления вторичных метаболитов. Так, практически все клетки в каллусе *Macleaya microcarpa* обладают способностью синтезировать изохиноновые алкалоиды, но их накопление осуществляется лишь в специализированных «алкалоидных» клетках. Исследователи, работающие с культурой ткани, неоднократно наблюдали, что при образовании в каллусной ткани морфологических структур (побегов, корней, эмбриоидов и др.) содержание продуктов в культуре увеличивается. Так, культура ткани *Atropa belladonna* при недифференцированном росте не продуцировала гиосциамин, а при образовании корней в каллусе, начинался синтез алкалоидов. Индукция морфогенеза в культуре ткани *Papaver bracteatum* привела к появлению алкалоидов тебаина и морфина, тогда как в недифференцированных каллусных тканях накапливались сангвинарин и допамин. Интерес представляют цитодифференцировки, происходящие в тканях *Catharantus roseus* при переносе их с ростовой среды в продукционную среду. В цитоплазме паренхимных клеток при выращивании их в течение двух недель на «алкалоид-продуцирующей» среде появились большие липидные капли, что коррелировало с накоплением алкалоидов.

Селекция. Промышленное применение культур растительных тканей в качестве лекарственных средств предполагает использование высокопродуктивных и стабильных клонов. Культивирование клеток *in vitro* может сопровождаться значительным генетическим разнообразием (сомаклональная изменчивость). Сомаклональные вариации могут затрагивать хозяйственно ценные признаки. На изменчивости клеток в культуре *in vitro* основана селекция штаммов, обеспечивающая больший выход ценных продуктов метаболизма растительной клетки. Так, при клонировании суспензионной культуры клеток паслена выделили линии, накапливающие более 3 % соланидина. Успех в селекции в значительной степени зависит от внедрения методов количественной оценки селекционного материала. Так, вопросы быстрого и несложного определения алкалоидов в растительном сырье для селекционных целей неоднократно привлекали к себе внимание исследователей. Высокопродуктивные клоны культуры ткани табака были отселектированы благодаря полуколичественному методу определения алкалоидов с применением реактива Драгендорфа; ярко-голубая флуоресценция серпентина в УФ свете была использована в селекции высокоалкалоидных штаммов суспензионной культуры *Catharantus roseus*. Для количественной оценки содержания аймалина в культуре ткани *Rauwolfia serpentina* разработан быстрый и несложный экспресс-метод, основанный на сравнении интенсивности окраски пятен сока каллусных культур, нанесенных на фильтровальную бумагу и обработанных цветным реактивом, со шкалой стандартов. Данный метод позволяет исключить заведомо неперспективные варианты и сократить количество культур, подлежащих окончательной проверке. В 70-х гг. XX в. для анализа

алкалоидов применен радиоиммунологический анализ, а позднее иммуноферментный метод диагностики, что позволило значительно повысить эффективность отбора.

Опыт селекционной работы с культурами тканей продуцентов свидетельствует о том, что при использовании мутагенов, селективных сред и высокоэффективных методов отбора возможен успех в селекции штаммов. Так, после воздействия мутагена этиленимина на клетки *Rauwolfia serpentina* была выделена клеточная линия, отличающаяся повышенным содержанием аймалина. Успешной оказалась селекция, основанная на отборе окрашенных участков культуры ткани. Окраска тканей растений является наследственным признаком, связанным с их химическим составом. Так, связь между окраской тканей и их химическим составом была использована в селекции высокопродуктивных по содержанию антрацианидов культур тканей моркови. После 12 пассажей содержание антрацианидов увеличилось в 3 раза.

Важным условием биотехнологического использования культур тканей является их стабильность, гарантирующая стандартность лекарственного растительного сырья. Однако для многих культур тканей, например, *Catharantus roseus*, единственным путем сохранения высокой продуктивности является регулярный поддерживающий отбор, т.к. их нестабильность – серьезное препятствие к промышленному использованию.

Таким образом, селекция в культуре растительных тканей осуществляется разными методами, которые можно классифицировать на следующие группы:

- ✓ непосредственный отбор форм, оказавшихся практически ценными;
- ✓ селекция колоний определенного морфологического типа;
- ✓ селекция мутантов, устойчивых к токсическим предшественникам или конечным продуктам;
- ✓ выделение ауксотрофных мутантов;
- ✓ получение мутантов устойчивых к аналогам аминокислот или азотистых оснований;
- ✓ получение штаммов путем обработки клеток химическими веществами, индуцирующими высокую ploидность;
- ✓ селекция устойчивых рекомбинантных штаммов и др.

Основой биотехнологического использования культур тканей растений является способность клеток *in vitro* синтезировать самые разнообразные группы веществ: фенольные соединения, гликозиды, эфирные масла, каротиноиды, алкалоиды и др. В некоторых случаях культуры тканей вместо ожидаемых продуктов накапливают близкие по биогенезу вещества, являющиеся биогенетическими предшественниками, которые в результате химического или ферментативного синтеза можно легко превратить в целевой продукт, подобно тому, как из стероидных соединений растительного происхождения синтезируют гормоны.

### **3. Этапы получения БАВ с помощью клеточных технологий**

Этапы создания производств БАВ, базирующихся на использовании культуры растительных клеток и тканей:

1. Экономически обоснованный выбор объекта. Растения, выбранные для введения в культуру, должны содержать значительное количество ценных, экономически важных вторичных метаболитов.

2. Первичное введение тканей в культуру. Для этих целей отбираются отдельные растения, обладающие наиболее высоким содержанием целевого вещества. Обычно на их основе получают каллусы на плотных питательных средах.

3. Химическое изучение биомассы по количественному и качественному составу вторичных метаболитов. Проллиферирующие каллусные клетки растений за редким исключением содержат вторичные метаболиты в меньшем количестве, чем органы целого растения, а это свидетельствует о том, что в интактном растении их синтез находится под

контролем цитодифференцировки. Подавление дифференциации клеток в культуре ведет к снижению их биосинтетического потенциала в отношении вторичных метаболитов. Неполная реализация генетических возможностей клетки может быть связана и с другими причинами, например, с нарушениями автотрофности питания при переходе к гетеротрофному типу питания (на искусственных питательных средах). Кроме того, под воздействием различных факторов может изменяться качественный состав продуктов. У некоторых растений переход к биосинтезу вторичных метаболитов наступает при замедлении роста, поэтому для них применяют двухступенчатые режимы культивирования: вначале создают условия для интенсивного роста клеточной массы, а затем – для биосинтеза БАВ. В качестве экспресс-методов оценки каллусных культур применяют радиоиммунохимический и иммуноферментный методы, отличающиеся высокой скоростью проведения анализов и возможностью их автоматизации.

4. Оптимизация сред и параметров выращивания клеточных культур. Для реализации генетической информации (относительно вторичного метаболизма) требуются специфические условия, а т.к. нет полной уверенности в том, что применяемые питательные среды отвечают потребностям клеток, в каждом конкретном случае приходится подбирать среду и другие факторы культивирования, опираясь на опыт предыдущих исследований. Данная работа еще более усложняется при переводе культуры в жидкую среду, т.к. при этом следует учитывать влияние аэрации, перемешивания и т.п.

5. Создание продуктивных штаммов клеток. Получение гомогенной популяции клеток с высоким содержанием тех или иных вторичных метаболитов является сложной задачей, т.к. популяции длительно культивируемых клеток, даже полученные клонированием одной высокопродуктивной клетки, могут терять способность к синтезу данного соединения. Для поддержания на высоком уровне способности клеток к видоспецифическим биосинтезам, помимо оптимизации условий выращивания, требуются значительные усилия, связанные с генетическими манипуляциями и клеточной селекцией. Для организации рентабельного крупномасштабного производства на основе клеточной технологии необходимы мутанты, не требовательные к питательным средам, устойчивые к осмотическому и механическому стрессу. В этой связи получение мутантов в культуре клеток приобретает все большее распространение. Так, обработка каллусных клеток раувольфии змеиной этиленамином позволила получить клеточную линию, отличающуюся высоким содержанием антиаритмического алкалоида аймалина. Дальнейшая оптимизация условий выращивания этой линии привела к увеличению продуктивности культуры по аймалину в 10 раз по сравнению с растением. Более эффективным приемом создания продуктивных штаммов является искусственное конструирование клеток методами клеточной инженерии.

6. Первичное использование лучших штаммов в суспензионной культуре. Каллусные клетки, первоначально полученные на плотной питательной среде, переводят в жидкую среду. Изменение режима культивирования не должно приводить к потере штаммом своих положительных качеств, т.е. штамм должен быть устойчив к стрессовым условиям культивирования. Это особенно касается момента переноса клеток из условий лабораторного эксперимента в небольшие колбы в ферментеры больших размеров. В настоящее время в биотехнологических производствах центральная роль принадлежит ферментерам с автоматической регуляцией разных параметров процесса (температуры, газового состава, освещенности, кислотности, содержания физиологически активных веществ) на любом этапе развития культуры.

7. Выращивание продуктивного и устойчивого штамма в условиях, приближающихся к производственным, в ферментерах с последовательным увеличением их вместимости. Если в таких полупромышленных условиях культивируемые клетки сохраняют высокие скорости роста и биосинтеза целевого БАВ, накапливают его без деградации и в значительных количествах выделяют в среду, то такой штамм пригоден

для организации крупномасштабного производства. Кроме того, важным качеством производственного штамма является его генетическая стабильность.

#### 8. Составление технологического регламента на производство биомассы.

### **4. Техника культивирования изолированных тканей растений**

Методика получения культуры растительных клеток и тканей довольно хорошо отработана и, как правило, не вызывает затруднений. Для получения культуры клеток из любой части растения (стебель, лист и т.п.) вычлняют эксплант (кусочек растительной ткани размером 0,5–1 см), его стерилизуют и помещают на питательную среду определенного состава. Через несколько суток на изолированном кусочке ткани растения образуется каллус (бесформенная масса растительной ткани). Образовавшийся каллус в асептических условиях отделяют и переносят на свежую питательную среду для дальнейшего роста, который происходит в контролируемых условиях при температуре 24–28 °С. Формирование каллуса обычно длится 1–2 мес. Полученную каллусную культуру можно поддерживать в таком состоянии неограниченно длительное время, периодически ее расчлняя и пересаживая на свежую питательную среду. Внешне такая культура совершенно не похожа на растение, от которого была получена, но ее клетки несут генетическую информацию, свойственную данному виду.

Культивирование растительных культур можно осуществлять на агаризованных питательных средах, имеющих плотную консистенцию, или в жидкой питательной среде. В первом случае ткани образуют скопление недифференцированных клеток, называемых каллусом или биомассой, а во втором – суспензии. Кроме того, в настоящее время разрабатываются комбинированные методы культивирования.

### **Стадии получения БАВ на основе культуры растительных клеток и тканей**

#### **1. Подготовка посевного материала**

##### **1.1. Подготовка экспланта**

Необходимым условием работы с культурой изолированных растительных тканей является соблюдение стерильности, т.к. богатая по составу питательная среда является прекрасным субстратом для развития посторонней микрофлоры, а изолированные от растений фрагменты (экспланты) легко подвержены микробной контаминации. В этой связи стерилизации должны подвергаться и экспланты, и питательные среды.

Стерилизацию экспланта и семян проводят путем их выдерживания в течение 5–20 мин. в стерилизующих растворах с последующей многократной промывкой стерильной водой. Время стерилизации во многом зависит от характера экспланта и стерилизующей активности раствора. Обычно семена стерилизуют в течение 10–20 мин., вегетативные части растений – 5–10 мин. Органы растений, из которых берут эксплант, предварительно моют мыльным раствором с щеткой, споласкивают водой очищенной, затем погружают на несколько секунд в 70 % этанол. Семена погружают в этанол на 1–2 мин. Кроме собственно стерилизующего действия спирта, обработка тканей этанолом перед погружением в основной стерилизующий раствор повышает стерилизующий эффект последнего. После стерилизации растительные объекты должны быть тщательно промыты стерильной водой.

##### **1.2. Подготовка посевного материала**

Подготовка посевного материала – одна из ответственных стадий биотехнологического производства БАВ на основе культур растительных клеток и тканей.

Культуру растительной ткани предприятия получают из НИИ, академий и университетов. Каждая культура имеет паспорт с подробным описанием морфологии, физиологии, характеристики среды для культивирования, режима культивирования, условий хранения и транспортировки.

При твердофазном методе культуру ткани выращивают на стерильной агаризованной питательной среде в колбах вместимостью 0,25 л в термостатируемом помещении или термостате при температуре  $27 \pm 1$  °С. На 38–46 сут. материнскую культуру расчлняют так, чтобы инокулюм состоял из вертикального столба (верхний слой, средний и часть нижнего слоя без агаризованной среды). Следует отметить, что воздействие на культуру растительных клеток и тканей дезинфицирующих средств и бактерицидных ламп недопустимо, т.к. приводит к инаktivации роста. Из одной материнской культуры пересаживают 7–9 дочерних культур и через 38–49 сут. роста в термостатируемом помещении отбирают колбы с культурами тканей, отличающимися лучшими ростовыми признаками (быстрый рост, максимальное использование компонентов питательной среды, цвет ткани от светло-желтого до молочного, отсутствие некротических включений).

При глубинном (суспензионном) методе культуру ткани предварительно выращивают на стерильной агаризованной питательной среде в пробирке, затем из пробирок высевают в колбы с жидкой питательной средой и проводят две генерации глубинного выращивания на специальных аппаратах для встряхивания в течение 38–46 сут. для каждой генерации. Из второй генерации культуры (в колбе) делают посев в небольшой (10 л) инокулятор, затем хорошо развивающуюся культуру переносят в основной ферментер. Для посева в ферментере используют 5–10 % (об.) посевного материала.

## **2. Подготовка питательных сред**

**Стерилизация питательных сред** в промышленных условиях осуществляется двумя основными методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод стерилизации используют для небольших объемов питательной среды. Данный способ стерилизации заключается в том, что питательная среда, нагретая до определенной температуры (120–125 °С) непосредственно в ферментерах или специализированных паровых стерилизаторах, выдерживается при этой температуре в течение 30–60 мин., и после охлаждается до 27–30 °С.

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять при больших объемах питательной среды. Приготовленная среда из специального реактора с помощью насоса подается в стерилизационную колонну, через которую пропускается острый пар под давлением около 5 атм. Пар подается сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорези, благодаря чему он поступает в среду, быстро ее нагревая. Среда в колонну подается снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы. Среда, нагретая в колонне до необходимой для стерилизации температуры (около 125 °С), поступает в специальный аппарат (выдерживатель), в котором выдерживается при температуре 120–125 °С. Время выдерживания зависит от состава среды и, как правило, составляет 5–10 мин. Из выдерживателя стерильная среда поступает в змеевиковый холодильник, в котором охлаждается до 30–35 °С и затем в ферментер. Непрерывный метод стерилизации характеризуется рядом преимуществ по сравнению с периодическим: высокая эффективность, быстрый и равномерный нагрев среды и возможность автоматического регулирования процесса.

Если в состав питательной среды входят вещества, разрушающиеся при высокой температуре, их подвергают холодной стерилизации, пропуская через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22–0,45 мкм, после чего добавляют в проавтоклавированную охлажденную до 40 °С основную среду.

**Химический состав питательных сред.** Важный фактор создания эффективной биотехнологической системы – правильный подбор питательной среды, обеспечивающей потребности культуры растительных клеток в компонентах, необходимых для обеспечения оптимального биосинтеза целевого продукта. Обязательными компонентами

питательных сред служат смеси минеральных солей, макро- (азот, фосфор, калий и др.) и микроэлементы (бор, марганец, цинк и др.), витамины, фитогормоны (или их синтетические аналоги), выступающие как факторы регуляции процессов клеточного деления и дифференциации. Вследствие того, что питание культур растительных клеток осуществляется гетеротрофным способом, источник углерода вводится в состав питательной среды, как правило, в виде углеводов (сахароза и др.). Получение автотрофных культур тканей пока еще задача будущего.

При приготовлении плотных питательных сред в качестве подложки используют агар-агар, образующий с водой гель или другие гелеобразующие вещества (силикагели, биогели, полиакриламидные гели, пенополиуретаны и др.).

В целом все компоненты питательной среды, необходимой для культур растительных клеток и тканей, можно подразделить на 6 групп:

1. неорганические питательные вещества (макроэлементы);
2. микроэлементы;
3. источники железа;
4. органические добавки (витамины);
5. источники углерода;
6. регуляторы роста растений.

Макроэлементы. Большое влияние на синтез вторичных метаболитов оказывает минеральный состав питательной среды. При этом наиболее значимыми компонентами являются азот, фосфор, калий. Однако следует учитывать, что их влияние весьма специфично, как в отношении вида растения, так и в отношении того или иного целевого продукта, о чем свидетельствуют следующие примеры. Так, если у одних культур растительных клеток органические формы азота (пептон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и др.) тормозят накопление вторичных метаболитов, то у других повышают эффективность их синтеза. Кроме того, на эффективность синтеза БАВ существенное влияние оказывает соотношение аммонийной и нитратной форм азота в питательной среде (увеличение нитратного азота в среде приводит к повышению синтеза диосгенина культурой клеток диоскореи). Азот, как правило, вводят в среду в форме нитратов, перерабатываемых клетками с помощью нитратредуктазы. Высокое содержание нитратов, ионов аммония, калия и фосфата способствует быстрому росту клеток. Истощение среды значительно снижает рост и процессы вторичного метаболизма. Однако изначально низкое содержание фосфатов в среде способно стимулировать синтез вторичных метаболитов. Так, культивирование каллусов солодки голой на среде с половинной концентрацией азота и фосфора в темноте увеличивает содержание фенольных соединений в 1,6 раза по сравнению с каллусами, растущими на полной среде.

К микроэлементам, необходимым для роста и развития растительных культур относятся: бор, марганец, йод, медь, кобальт, молибден и др. Так, недостаток марганца в среде препятствует синтезу белков, уменьшает количество РНК и приводит к увеличению содержания свободных аминокислот; железо необходимо для деления ядра и функционирования дыхательных ферментов.

Кроме того, к веществам, играющим значительную роль в развитии культур растительных тканей, относятся витамины. Так, тиамин (анейрин, витамин В<sub>1</sub>) участвует в процессе роста корней (многократные пассажи кончиков корней без него невозможны). Для роста корней, помимо тиамина, необходимы и другие витамины: горох и редис нуждаются в никотиновой кислоте, томаты – в витамине В<sub>6</sub> или в его комплексе с никотиновой кислотой, лен – в тиаминах и т.п. Аскорбиновая кислота (витамин С) важна для роста побегов. Ее введение в среду ускоряет укоренение черенков и стимулирует прорастание пыльцы. Предполагают, что она имеет отношение к обмену ростовых веществ. Действие аскорбиновой кислоты основано на ее окислительно-восстановительных свойствах. Для роста и развития растительных культур также

необходимы вещества биоса (комплекс витаминов), к которым относятся: мезоинозит, биотин и пантотеновая кислота. При этом пантотеновая кислота может быть заменена  $\beta$ -аланином, из которого культуры, вероятно, самостоятельно синтезируют пантотеновую кислоту.

Органические соединения. Углеводы являются необходимым компонентом питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, т.к. в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще в качестве углевода используют сахарозу или глюкозу в концентрации 2–3 %. Следует отметить, что повышенные концентрации сахарозы в среде, как правило, приводит к увеличению выхода вторичных метаболитов, но вместе с тем ее высокие концентрации повышают осмотический потенциал среды, влияние которого на метаболизм полностью не изучено. Кроме того, увеличение содержание сахарозы в среде удорожает производство, поэтому поиск доступных углеводных добавок остается актуальным.

Органические добавки неопределенного состава (гидролизат казеина, кокосовое молоко и др.) способны оказывать буферное действие. Кроме того, в среду могут быть добавлены эндоспермы незрелых зародышей (кокосовый орех, конский каштан и др.), пасока некоторых деревьев, различные экстракты и соки (солодовый и дрожжевой экстракты, томатный сок и др.). Введение в среду данных компонентов позволяет получить интересные результаты, однако, такие эксперименты трудно воспроизводимы, т.к. действующий ингредиент, как правило, точно не известен. Так, добавление в питательную среду отдельных фракций кокосового молока не давало никаких результатов, в то время как нефракционированный эндосперм вызывал деление клеток.

Фитогормоны – вещества, которые синтезируются в растениях, транспортируются по ним и в малых концентрациях способны вызывать ростовые или формативные эффекты по месту образования и на расстоянии от него. К их характерным особенностям относятся:

1) эндогенное происхождение: большинство фитогормонов образуется из органических кислот, в частности – аминокислот. Изменения в интенсивности синтеза того или иного фитогормона, вызванные внутренними или внешними причинами, приводят к ответной реакции растения – изменению показателей ростовых или формативных процессов;

2) передвижение их по растению: фитогормон, образовавшийся в одном органе, обладает свойством регуляции ростовых процессов в других органах. Именно таким путем достигается взаимовлияние органов и целостность растения. Ряд веществ, обладающих высокой регуляторной способностью, например некоторые фенольные соединения, не могут быть признаны фитогормонами, т.к. неспособны к передвижению по растению и воздействуют лишь в месте своего синтеза;

3) способность в малых концентрациях вызывать заметные ростовые или формативные эффекты: фитогормоны действуют на растение в малых концентрациях ( $10^{-13}$  –  $10^{-7}$  М). Примером ростового эффекта может служить ускорение или замедление роста стебля, а формативного – дефолиация (обезлиствление);

4) действие не только в местах образования, но и на расстоянии от них.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и индукции клеточных делений. В этой связи для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов в среде может быть снижено или они могут быть полностью исключены из питательной среды.

В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК),  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК). Для получения рыхлого хорошо растущего каллуса чаще применяют 2,4-Д, т.к. ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. М. Ценк с сотр. изучили влияние 146 соединений с ауксиновой активностью на рост и образование

антрахинонов у культуры клеток моринды лимнолистной (*Morinda citrifolia*) из семейства мареновых, и установили, что многие из них поддерживали хороший рост клеток, но только ИУК и 2, 3, 6-трихлорбензойная кислота – наряду с поддержанием роста стимулировали образование антрахинонов.

В качестве источников цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), зетин. 6-БАП и зетин проявляют более высокую активность в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза по сравнению с кинетином. В состав некоторых сред входит аденин.

Ауксины открыты в 20-е гг. как фактор тропизмов растений. Ф. Кегль в начале 30-х гг. выделил в чистом виде и установил химическое строение природного ауксина – ИУК. Основным местом синтеза ауксинов являются апикальные меристемы стебля, откуда они поступают в другие органы. В меньшей степени синтез этого фитогормона происходит в листьях, причем в молодых листьях ауксина образуется больше, чем в старых.

Механизм поглощения ауксина клеткой включает 2 фазы: 1) быстрое обратимое поглощение, происходящее по механизму, близкому к диффузии, когда между клеткой и окружающей ее средой устанавливается равновесие в концентрации ауксина. Достижение этого равновесия зависит не только от разницы концентраций ИУК в растворе и клетке, но и от pH раствора и цитоплазмы. Возможно, что поступление ИУК в клетку участвуют и специфические переносчики, роль которых особенно велика при pH, близком к нейтральному. Продолжительность этой фазы 25–30 мин.; метаболическое накопление. В это время ауксин связывается с разными компонентами клетки, чаще всего с образованием глюкозного эфира или индолил-3-ацетиласпарагиновой кислоты. Связанный ауксин не участвует в клеточной регуляции и представляет собой запасную форму гормона.

Физиологические эффекты ауксина связаны с его действием на клеточном уровне, которое проявляется в регуляции растяжения, деления и дифференцировки.

Как уже отмечалось, механизм растяжения клеток под действием ауксина обусловлен активацией протонной помпы (процесс переноса протонов через клеточные мембраны с помощью специализированных белков), приводящей к подкислению клеточной стенки, и ее последующим растяжением за счет тургорного давления вакуоли.

Растяжение клеток и размягчение клеточных стенок под действием ауксин-активируемой протонной помпы может играть важную роль в процессах дедифференцировки и последующего деления, наряду с активацией ферментов, участвующих в разрыхлении клеточной стенки – целлюлазы и пектиназы.

Индукция ауксином клеточных делений также обусловлена и тем, что он создает условия, необходимые для репликации ДНК, включающие в себя стимулирование дыхания, синтеза РНК и белков.

Ауксин вызывает не только дедифференцировку. Он способен стимулировать дифференциацию меристематических или дедифференцированных клеток в клетки проводящих тканей. Под действием ауксина отмечается формирование проводящих флоэмных и ксилемных элементов в каллусной ткани, что имеет большое значение в биотехнологии и практике растениеводства.

Аттрагирующее (притягивающее) свойство ауксина определяет и такое важное в жизни растения свойство, как апикальное доминирование. Апекс, продуцирующий этот фитогормон, представляет собой мобилизационный центр, к которому притекают питательные вещества и другие фитогормоны (гиббереллины и цитокинины). Вследствие этого питательные вещества и фитогормоны практически не поступают к пазушным почкам, которые поэтому не растут или растут гораздо медленнее, чем верхушечная почка. Механизм аттрагирующего действия практически не изучен. Есть основания полагать, что он связан с активацией протонной помпы.

Цитокинины открыты в 1955 г. как факторы, стимулирующие деление клеток. Первый природный цитокинин был назван зеатином, т.к. это вещество выделено из

незрелых семян кукурузы. Известно еще 12 цитокининов, их химическое строение близко к строению зеатина. Показана высокая цитокининовая активность у дифенилмочевины и ряда ее производных.

Цитокинины синтезируются главным образом в апикальных меристемах корня, откуда активно транспортируются с пасокой по ксилеме. В этой связи, скорость передвижения цитокининов гораздо выше, чем у ауксинов. Направление транспорта – акропетальное, особенно много цитокининов обнаруживается в активных меристемах и семенах.

Стабильность цитокининов в растении невысока, время полураспада зеатина составляет в зависимости от вида растения и его органа от 6 до 20 ч. Скорость разрушения в молодых тканях ниже, чем в старых. Медленнее всего этот процесс идет в корнях. Деструкция цитокининов начинается с конъюгирования с сахарами (рибоза, глюкоза) и аминокислотой аланином. При этом путь образования О-глюкозидов цитокинина можно рассматривать как запасание этого гормона, а другие – как необратимую деструкцию. Недавно открыт фермент цитокининоксидаза, окисляющий цитокинин без предварительного гликозидирования. Окисление при этом происходит по месту присоединения алифатической части к аденину.

Основной физиологический эффект цитокинина заключается в активации клеточных делений. В отличие от ауксина, создающего необходимые условия для митоза, выражающиеся в дедифференцировке и репликации ДНК, т.е. в иницировании митоза, цитокинин активирует следующие стадии: работу РНК-полимераз, образование РНК и синтез белков. Возможно, что эти эффекты связаны с аттрагирующим действием цитокинина.

Аттрагирующее действие частично обуславливает и ряд других эффектов данного фитогормона, к числу которых можно отнести стимулирование роста клеточистьев и семядолей, снятие апикального доминирования, задержку старения листьев и регуляцию передвижения веществ в растении.

Значительную роль цитокинин играет и в регуляции органогенеза. Преобладающая концентрация этих гормонов задерживает образование корней и ускоряет закладку стеблевых почек. Они также способны индуцировать зацветание некоторых видов растений в условиях неблагоприятного фитопериода.

Под действием цитокинина покоящиеся семена и клубни ряда культур выходят из состояния покоя. Возможно, что это связано с активацией синтеза гидролитических ферментов.

Цитокинины не только задерживают старение листьев, но и регулируют формирование хлоропластов на ранних стадиях развития листа, а также их рост и деление за счет стимулирования синтеза хлоропластных РНК и белков.

Цитокинины участвуют также в регуляции транспирации листьев, открывая устьица, что наряду со стимулированием формирования хлоропластов и задержкой старения листьев приводит к большей фотосинтетической активности.

Очень важным свойством цитокининов является их способность повышать устойчивость клеток растения к различным неблагоприятным воздействиям – повреждающим температурам, недостатку воды, повышенной засоленности, рентгеновскому излучению, фитотоксичным воздействиям пестицидов. Механизм такого защитного еще не совсем ясен. Однако установлено, что повышение уровня цитокининов при неблагоприятных условиях жизни растения стимулирует синтез стрессовых белков, защищающих клетку.

В настоящее время известно большое число разных по составу питательных сред, но наиболее часто применяемая при выращивании изолированных растительных тканей в условиях *in vitro* среда Т. Мурасига и Ф. Скуга, впервые составленная в 1962 г. Эта среда содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других, как правило, содержанием аммонийного и нитратного азота. Данная среда является самой

универсальной. Она пригодна для образования каллусов, поддержания неорганизованного каллусного роста, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. Так, изменение соотношения ауксина и кинетина приводит к образованию или корней (преобладание ауксина), или стеблевых культур (преобладание кинетина).

Среда Гамборга и Эвелега хорошо подходит для культивирования клеток и тканей бобовых растений и злаков, среда Уайта обеспечивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после регенерации, а среда Нича и Нич пригодна для индукции андрогенеза в культуре пыльников.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар, который представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей.

С целью рационального использования времени растворы солей макро- и микроэлементов, а также витаминов и фитогормонов готовят более концентрированными, что позволяет их многократно использовать. Концентрированные (маточные) растворы хранят в холодильнике.

### **3. Биосинтез БАВ**

Биосинтез – основная стадия биологического процесса получения БАВ на основе культуры растительных тканей. Задача данной стадии заключается в создании для продуцента условий развития, обеспечивающих максимальный уровень биосинтеза БАВ. Эффективность этой стадии зависит от уровня образования БАВ и определяется генетическими особенностями организма, составом питательной среды, режимом развития продуцента, от времени максимального образования БАВ, стоимости компонентов среды, пеногасителей, энергетических затрат, связанных с развитием продуцента.

В настоящее время производство БАВ на основе культуры растительных тканей осуществляют 2 способами: культивирование на поверхности твердой среды (твердофазная ферментация) и погруженное глубинное культивирование (суспензионное).

#### **3.1. Условия культивирования**

На рост и развитие растительных тканей *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы – свет, температура, аэрация, влажность.

Свет. Большинство каллусных тканей не нуждаются в свете (могут расти в условиях слабого освещения или в темноте), т.к. не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно. В некоторых случаях каллусные ткани, не способные к автотрофному питанию, все же выращивают при непрерывном освещении, что является необходимым условием дальнейшего успешного морфогенеза (люцерна). В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Для большинства травянистых растений оптимум освещенности составляет примерно 1000 люкс. Слишком низкая (300 люкс) или высокая (3000–10000 люкс) освещенность подавляет рост. Освещение может влиять на метаболизм каллусных клеток. Так, в культурах чайного растения под действием света увеличивался биосинтез полифенолов. Напротив, в культуре клеток *Scopolia parviflora* подавлял образование алкалоидов. Кроме интенсивности освещенности на культуру ткани и ее физиологические особенности влияет качество света. Так, более 20 флавонов и флавоноловых гликозидов образуется в культурах клеток петрушки после ее освещения непрерывным люминесцентным светом «холодный белый». Вместе с тем синтез флавоновых гликозидов активируется при последовательном облучении УФ светом, а затем светом, лежащим в области «красный – длинноволновый красный».

Температура. Для большинства каллусных культур оптимальна температура 25–26 °С. В то же время каллусы и культуры клеток диоскореи дельтовидной хорошо растут даже при температуре 32 °С. В отличие от роста культур клеток и тканей индукция их морфогенеза требует более низких температур (18–20 °С). Влияние температуры на метаболизм клеток *in vitro* изучено слабо. Получены данные, что в каллусных культурах

максимальное образование алкалоидов наблюдалось при температуре 25°C, а при повышении температуры резко снижалось. В суспензионных культурах клеток *Irotomea* содержание жирных кислот значительно увеличивалось, если их выращивали при субоптимальных температурах роста (15 °C). В этой связи при выращивании культуры *in vitro* необходимо тщательно изучать влияние всех абиотических факторов, в том числе температурного, на рост и метаболизм клеток.

Аэрация. Для выращивания суспензионных культур большое значение имеет аэрация. Особенно важно снабжение воздухом культивируемых клеток в больших объемах ферментеров. При сравнении разных типов ферментеров установлено, что синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре был наибольшим при подаче воздуха снизу. При выращивании клеток в малых объемах (в колбах) нормальная аэрация достигается при постоянном перемешивании суспензии.

Влажность. Оптимальная влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60-70 %, т.к. более сухой воздух способствует усыханию питательной среды в пробирках и колбах, изменению ее концентрации и нарушению условий культивирования. Для увеличения влажности воздуха в комнате можно использовать поддоны с водой.

Пеногашение. Особое внимание при развитии продуцента в ферментерах следует уделять пеногашению. При продувании воздуха через биореактор происходит обильное пенообразование, нарушающее развитие продуцента. Основной причиной образования избыточного количества пены является высокая вязкость питательной среды, обусловленная обильным накоплением биомассы. Для устранения избыточного пенообразования в ферментерах используют разные поверхностно-активные вещества (ПАВ): растительные и минеральные масла, спирты и жирные кислоты и др.

Таким образом, культивирование клеток и тканей растений зависит от многих факторов внешней среды, и действие их не всегда хорошо изучено. В этой связи при введении в культуру нового растения необходимо, прежде всего, тщательно изучить влияние физических факторов на рост и физиологические характеристики этой культуры.

Выращивание культур растительных тканей, как правило, проводят в течение 70 сут. В период ростового цикла осуществляют следующие виды контроля: микробиологический, биохимический и визуальный. Визуальный контроль проводят не реже 1 раза в 10 дней – отбраковывают инфицированные ткани.

### **3.2. Аппаратурное оснащение фитобиотехнологических производств**

Особенностями растительных клеток являются: 1) склонность к объединению в тканевые структуры, которые в целостном организме «омываются» жидкостями определенного состава, содержащими многие регуляторные вещества, оказывающие заметное влияние на функцию тканей; 2) малые скорости роста и развития, а некоторые из них вообще не культивируются в глубинных условиях на жидких средах; 3) хемогетеротрофизм растущих клеток в культуре; 4) синтез целевого продукта лишь агрегатами клеток.

Биотехнологическое производство вторичных метаболитов растений осуществляется преимущественно при культивировании клеточных суспензий. Очень большое значение для их роста и образования целевых продуктов имеют технические характеристики систем культивирования. Длительное время для создания технологий промышленного выращивания суспензионных культур применялись аппараты, разработанные для микробиологической промышленности. Однако исследования последних лет показали, что растительные клетки в силу своих специфических особенностей требуют особое оборудование для культивирования. Клетки растений в десятки, сотни раз крупнее клеток бактерий и грибов, их размеры изменяются в процессе онтогенеза. Если в начале экспоненциальной фазы роста они мелкие и плотные, то в стационарной фазе роста они сильно увеличиваются в размерах и вакуолизируются. Чем крупнее становится клетка, тем

больше возрастает опасность ее механического повреждения. В то же время клетки растений крупные и тяжелые требуют эффективного перемешивания.

В зависимости от принципа перемешивания культуральной жидкости биореакторы по своей конструкции подразделяются на два типа. В биореакторах первого типа перемешивание осуществляется только путем аэрирования воздухом: в барботажных – за счет поднимающихся пузырьков воздуха, в аэролифтных – с применением специальной конструкции с внутренним цилиндром, создающей градиент плотности суспензии (рис. 1). Для биореакторов второго типа характерно наличие механических перемешивающих устройств.

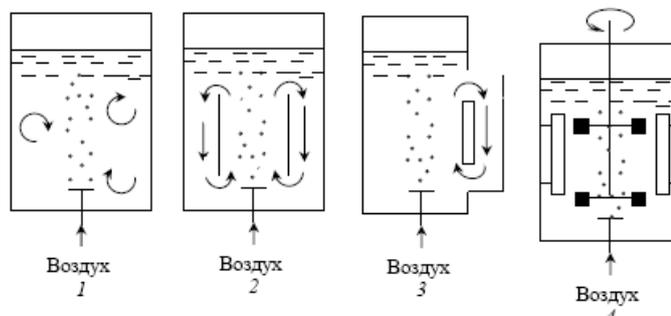


Рис. 1. Принципиальные схемы биореакторов для суспензионного культивирования: 1 – барботажный биореактор; 2 – аэролифтный биореактор; 3 – биореактор с вынесенной циркуляционной петлей; 4 – биореактор с механическим перемешивающим устройством; В – воздух.

Использование биореакторов для исследования популяций суспензионных культур имеет следующие преимущества:

- ✓ □ большой объем культивационного сосуда позволяет, не внося существенных возмущений, отбирать пробы большого объема, что важно при анализе вторичных метаболитов, часто содержащихся в очень низких концентрациях;
- ✓ □ возможность управления процессом культивирования по определенному алгоритму на основе показаний датчиков, установленных в биореакторах.

Вместе с тем культивирование клеточных суспензий в биореакторах связано и с рядом проблем:

- ✓ оседание клеток вследствие недостаточного перемешивания, что приводит к появлению мертвых зон в сосудах, в которых происходит быстрое накопление и старение клеток;
- ✓ увеличение вязкости суспензии вследствие роста биомассы, приводящее к адгезии (прилипанию) клеток друг к другу, поверхности культурального сосуда, погруженных в него мешалок и датчиков;
- ✓ образование в верхней части сосуда корки (безе), состоящей из полисахаридов, белков, слипшихся клеток и снижающей эффективность перемешивания, что, в конце концов, может привести культуру к гибели.

В настоящее время наиболее приемлемым способом получения больших количеств вторичных метаболитов растений является двустадийное культивирование. При этом первая стадия связана с образованием больших количеств биомассы культивируемой суспензии, а вторая предполагает создание условий для активного биосинтеза целевого продукта. Обеспечение оптимальных условий культивирования на обеих стадиях *in vitro* позволяет получить выход вторичного метаболита в количестве, синтезируемом *in vivo*, а иногда и выше.

Культуры растительных клеток в биореакторах выращивают в одном из двух режимов:

- ✓ первый – периодическое культивирование, при котором по окончании биосинтеза откачивают и используют всю суспензию клеток;

✓ второй – полупериодическое культивирование, при котором в биореактор постоянно добавляют определенный объем свежей питательной среды и одновременно забирают тот же объем или клеточной суспензии (открытое проточное культивирование), или отработанной питательной среды, оставляя при этом клеточную массу в биореакторе (закрытое проточное культивирование).

В основном растительные клетки выращивают в периодическом режиме. Полупериодическое культивирование используют, когда показано, что нарастание биомассы четко коррелирует с синтезом вторичных метаболитов.

Существуют также две разновидности открытого проточного культивирования:

✓ турбидостат – автоматическое поддержание концентрации клеточной биомассы в биореактор на одном уровне регулировкой скорости потока;

✓ хемостат – в биореактор с постоянной скоростью подается питательный раствор при одновременном откачивании с той же скоростью клеточной суспензии.

Помимо биореакторов для культивирования растительных клеток и тканей также применяют специальные мембранные контейнеры. Так, фирма «Sigma» (США) выпускает мембранные наборы для растительных культур тканей, что позволяет исключить влияния ингибиторов, нередко присутствующих в агар-агаре и других гелеобразующих агентах. Данные наборы предназначены для выращивания протопластированных и других культур, которые могут поддерживаться длительное время без смены культурального контейнера. Мембранные контейнеры имеют квадратную или круглую форму. Их изготавливают, как правило, из полипропилена. Они пригодны для потока воды 288 л/м<sup>2</sup>/ч. Мембраны таких контейнеров устойчивы к воздействию сильных кислот, оснований и органических растворителей (за исключением галогенизированных углеводов). Кроме того, фирма «Sigma» (США) производит фитатрей (от англ. *tray* – поднос) для растительных клеточных культур, размером 92×114×89 мм. Каждый фитатрей упаковывают в ящики по 100 кювет и крышек на ящик. Составные части фитатрея стерилизуют  $\gamma$ -лучами.

### **3. Выделение и очистка целевого продукта**

#### **Предварительная обработка биомассы или культуральной жидкости**

В процессе развития продуцента, БАВ почти полностью выделяются из клеток в культуральную жидкость. Однако в некоторых случаях лишь часть БАВ выделяется в культуральную среду, а другая часть сохраняется внутри клеток. У ряда продуцентов БАВ они почти полностью накапливаются внутриклеточно.

При твердофазном способе культивирования из колбы вместимостью 250 мл с выросшей культурой ткани вначале проводят съем сырой биомассы, затем сушку биомассы на противнях при температуре  $58 \pm 2$  °С. Время сушки биомассы зависит от начальной влажности и толщины слоя биомассы, температуры сушки. Окончание сушки определяют на ощупь: не должно быть мягких влажных комочков. Остаточная влажность биомассы после сушки должна составлять не более 12 %. После завершения предварительной обработки сухую биомассу, снабженную аналитическим паспортом на содержание БАВ, подают на стадию выделения и очистки БАВ.

При глубинном культивировании, если БАВ экскретируются в культуральную жидкость, то их выделяют традиционными методами: экстракцией органическими растворителями, несмешивающимися с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют ионообменными смолами.

Выделение БАВ, накапливающихся внутриклеточно, как правило, осуществляют экстракцией органическими растворителями. Если БАВ накапливаются и в культуральной жидкости, и в клетках продуцента, первичной операцией их выделения является перевод в фазу, из которой наиболее целесообразно их изолировать. Для этого БАВ, содержащиеся в культуральной жидкости и в клетках продуцента, переводят в осадок, и после экстрагируют.

Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят путем фильтрования или центрифугирования. Для фильтрования используют: фильтр-прессы (для обработки больших объемов культуральной жидкости), нутч- и друк-фильтры (для фильтрования небольших объемов культуральной жидкости).

Отделение мицелия или взвешенных частиц можно осуществлять в сепараторах. При скорости вращения барабана, равной 7000–7500 об/мин, благодаря центробежной силе, твердые частицы устремляются к стенкам барабана, где и осаждаются, а отсепарированная жидкость отводится из аппарата.

### **Выделение и очистка целевого продукта**

Стадия выделения и очистки целевого продукта включает ряд процессов: от обработки нативного раствора (культуральной жидкости) до сушки готового (очищенного) продукта. На данной стадии, в зависимости от физико-химических свойств БАВ, их химического строения и места локализации применяют разные методы их выделения и очистки. В качестве основных методов, как правило, используют экстракцию, осаждение, сорбцию, мембранные методы, кристаллизацию, выпаривание и сушку.

Особенностью стадии выделения и очистки целевого продукта является работа с невысокими концентрациями выделяемого БАВ (не более 2 %). В конце данной стадии имеют дело с более высокими концентрациями БАВ, составляющими 20–30 %.

Целью стадии очистки является извлечение БАВ из культуральной жидкости или из клеток продуцента, их концентрирование и освобождение от сопутствующих примесей и, в конечном счете, получение высокоочищенного целевого продукта.

БАВ растительного происхождения под влиянием жестких внешних факторов легко теряют свои свойства, инактивируются, поэтому при их выделении и очистке необходимо соблюдать максимальную осторожность.

### **Получение готового продукта**

К БАВ биотехнологического происхождения, применяющимся в медицинской практике, предъявляются очень высокие требования:

- ✓ высокая степень очистки;
- ✓ высокая фармакологическая активность;
- ✓ стерильность.

В этой связи на данном этапе работы, а также при химической очистке лекарственного средства необходимо соблюдать высокую степень чистоты на всех стадиях и операциях – поддерживать в исключительной чистоте не только применяемое оборудование, но и производственные помещения.

После выделения и химической очистки БАВ, целевой продукт необходимо высушить, т.е. удалить из него свободную и связанную влагу. Поскольку некоторые БАВ, в той или иной степени термолабильны, то для их высушивания необходимо применять щадящие методы, не приводящие к потере биологической активности и не изменяющие органолептические свойства целевого продукта.

На современном этапе получения БАВ используют различные методы обезвоживания продукта. Помимо обычных методов сушки, широкое распространение получила лиофильная сушка, реализуемая при сравнительно низких температурах (-8 – -12 °С). Кроме того, прогрессивным способом сушки в случае больших количеств раствора, содержащего БАВ, является распылительная сушка, при которой раствор БАВ пневматически распыляется до мельчайших капель в рабочей камере сушилки потоком нагретого воздуха. При этом процесс сушки осуществляется в течение нескольких секунд и термолабильные БАВ не изменяют своих свойств.

Фасовку целевого продукта, как правило, производят во флаконы светозащитного стекла.

Готовый продукт подвергается аналитическому, биологическому и фармакологическому контролю.

### 5. Частные биотехнологии: получение вторичных метаболитов на основе растительных культур

Из вторичных метаболитов в России, Японии и других странах получены противоопухолевые алкалоиды, шиконин из воробейника аптечного, убихинон Q-10 из табака, гипотензивные средства из барвинка розового, стимуляторы из женьшеня и т.п. В России производство культуры ткани женьшеня («Биоженьшеня») осуществляется в промышленном масштабе. Экстракт, получаемый из биомассы женьшеня, используется в косметологии в качестве БАД к кремам и лосьонам, в пищевой промышленности – для приготовления тонизирующих напитков. Кроме того, получено разрешение Фармакологического комитета при МЗ РФ на применение настойки из биоженьшеня, аналогичной по действию препаратам из нативного корня женьшеня. Для получения ценного противоаремического препарата аймалина на ХПХФО «Здоровье» (г. Харьков) организовано опытное производство биомассы культуры *Rauwolfia serpentina*.

Производство лекарственных субстанций из растений может быть осуществлено согласно одной из трех конкурентоспособных методик:

1. выращиванием растений, культивируемых на опытном поле;
2. выращиванием каллусных культур тканей высших растений и тканевых культур низших растений;
3. культивированием микроорганизмов.

Конкурентоспособность традиционных и биотехнологических методик получения БАВ представлена в табл. 2:

Наиболее экономически выгодны вторая и третья методики, т.к. реализуются в аппаратах, характеризующихся высокой производительностью и отличающиеся друг от друга только скоростью роста. Самой низкой конкурентоспособностью обладает методика выра-

Таблица 2

Сравнительная характеристика традиционных и биотехнологических методик получения БАВ

Методика выращивания растительной биомассы	Время роста	Методика выращивания животных тканей	Время роста
Выращивание растения на опытном поле	1–6 мес. и более	Традиционный способ разведения животных	1–9 мес. и более
Выращивание каллусных и меристематических клеточных культур	7–14 дней	Выращивание культуры клеток ткани на твердой питательной среде	7–10 дней
Культивирование микроорганизмов	1–3 дня	Культивирование микроорганизмов	1–3 дня

щивания растений на опытном поле, и соответственно, самой высокой конкурентоспособностью (из-за большей скорости роста), обладает методика культивирования микроорганизмов. В данном случае существенное значение имеет также и то, что микроорганизмы растут быстрее клеток растений и животных и способны развиваться на простых и доступных питательных средах. Следует отметить, что скорость культивирования низших растений сравнима со скоростью третьей методики, что

позволило получить новые доступные лекарственные препараты (фосфолипиды, этерефицированные эссенциальными жирными кислотами и простогландами групп E и F, арахидоновая кислота, простогландины групп E<sub>2</sub> и E<sub>22</sub>, антиоксиданты, аминокислоты, убихинон Q-10 и др.) для лечения язвенной болезни ЖКТ и стимуляции регенеративных процессов при кровотечении, кроветворении, ранозаживлении и т.п.

Рассмотрим некоторые частные биотехнологии получения БАВ, основанные на использовании растительных культур.

Простые фенолы. В процессе фитохимического изучения культуры ткани *Rhodiola rosea* была выделена серия соединений фенилпропанового ряда: производные оксикоричного спирта, п-кумаровой и кофейной кислот. Кроме того, обнаружены лигнаны, β-ситостерол и даукостерин. Главный компонент корневищ растения салидрозид в культуре ткани не обнаружен.

С 50-х гг. XX в. культура ткани табака *Nicotiana tabacum* служит модельным объектом в исследованиях по физиологии и генетике растительной клетки. После фитохимического исследования она была предложена в качестве продуцента убихинона, участвующего в клеточном дыхании. По своей химической структуре убихиноны являются п-бензохинонами, боковая цепь которых представлена 5–10 изопреновыми остатками. Активное изучение культуры ткани табака принадлежит японской фирме «Tobacco and Salt Public Corp.» и реализованы в промышленном получении биомассы табака в качестве продуцента убихинона-10.

Условия культуры ткани оказались благоприятными для биосинтеза розмариновой кислоты. Ее суперпродукция отмечена в культурах тканей *Anchusa officinalis* (12 %) и *Coleus blumei* (15 %).

Нафтохиноны. Известно, что корни воробейника краснокорневищного (*Lithospermum erythrorhizon*) содержат красный пигмент шиконин. Это растение издавна используется в Японии как лекарственное, т.к. оно обладает антимикробной, противодизентерийной и гонадотропной активностью. Кроме того, шиконин используется в качестве красящего вещества в косметической и пищевой промышленности. Шиконин – производное нафтохинона, вещество ярко-красного цвета. Для того чтобы концентрация шиконина в корнях растения достигла 1–2 %, его возраст должен составлять 5–7 лет. В связи с тем, что выращивать данное растение в промышленном масштабе в Японии не представляется возможным, его приходится ввозить из Кореи и Китая, а, следовательно, стоимость чистого природного вещества значительно увеличивается.

В этой связи весьма актуальным является биотехнологическое получение шиконина на основе культуры тканей растений. Клетки растений, как правило, не выделяют синтезируемые вторичные метаболиты в окружающую среду, а запасают их в вакуолях и органеллах, что затрудняет их выделение. Однако накопление шиконина связано с достаточно простым отбором наиболее продуктивных линий, т.к. клетки, содержащие данный пигмент, имеют ярко-красную окраску. Удалось выделить линию, накапливающую до 15 % шиконина. Последующая оптимизация среды культивирования позволила достичь тринадцатикратного увеличения продуктивности культуры тканей.

В первых работах этой серии в результате изучения факторов питания было обнаружено, что увеличение количества сахарозы и уменьшение концентрации азота в питательной среде стимулирует продукцию нафтохиноновых пигментов. Добавление стрептомицина, аскорбиновой кислоты или фенилаланина к культурам способствовало биосинтезу производных шиконина, в то время как ионы кальция и железа ингибировали этот процесс. Позднее было показано, что производные шиконина продуцировались суспензионной культурой только при исключении из среды аммония. Аммоний – агент, жизненно необходимый для клеточного роста, ингибировал биосинтез шиконина в суспензионной культуре. Первые штаммы культуры ткани *L. erythrorhizon* характеризовались как нестабильные, содержание шиконина в них варьировало от 0 до 1000 мкг на 1 г сухой ткани. Из этих культур были отобраны пигментированные штаммы,

содержащие около 20 % производных шиконина, что 10 раз больше, чем в корнях взрослого растения. Селекция высокопродуктивных штаммов проводилась визуально путем пересадочучастков каллуса, окрашенных в красный цвет, а также с помощью «протопластного» метода. В СССР в качестве продуцента шиконина НПО «ВИЛАР» успешно исследовалась культура клеток *Macrotomia euchroma*.

С целью увеличения выхода шиконина был разработан способ двухступенчатого культивирования, при котором на первой стадии создавались оптимальные условия для наращивания биомассы, а на втором – для образования целевого продукта. При этом клетки растут в суспензионной культуре. Для реализации данного процесса лучше всего подходят эрлифтные ферментеры, в которых осуществляется одновременно интенсивное перемешивание и разделение клеток. Кроме того, важным преимуществом аппаратов данного типа является то, что вероятность повреждения клеток минимальна. Биопроизводство шиконина начинается с наращивания клеточной биомассы в ферментере объемом 200 л, содержимое которого переносят в бioreактор объемом 750 л и после проводят экстракцию обычными методами. Выход целевого продукта за один цикл составляет 5 кг, стоимость которого значительно снижается по сравнению с его получением традиционным способом. В настоящее время в России уже несколько заводов микробиологической промышленности освоили производство биомассы корня женьшеня по вышеописанной технологии, разработанной под руководством Александровой И.В. (ВНИИ биотехнология).

Кроме того, шиконин можно выделять и иным способом – путем изменения pH среды или путем добавления веществ, влияющих на проницаемость растительной клетки. Реализация такого подхода целесообразна при работе с иммобилизованными клетками, т.к. в данном случае благодаря селективной проницаемости можно будет постоянно удалять вторичные метаболиты из внутриклеточных вакуолей без глубокого нарушения первичного обмена веществ.

Антраценпроизводные. Их биосинтез в культуре ткани можно регулировать изменением состава питательной среды и условий культивирования, из которых наибольшее влияние оказывает освещенность. Данные о воздействии света на метаболизм антрагликозидов немногочисленны и противоречивы. Так, в культуре ткани *Aloe saponaria* под влиянием света накапливались антрахиноны, в то время как тетрагидроантраценовые гликозиды, присутствующие в интактных растениях, в этих условиях не синтезировались. Суспензионная культура *Rhamnus purshiana*, растущая в темноте, накапливала главным образом фисцион и его восстановленные формы. Биосинтез антраценпроизводных (1,8-дигидроантрахиноны, антроны и диантроны) значительно усилился при культивировании клеток *R. urshiana* в условиях 12-часового светопериода. Цикличность освещения в наибольшей степени сказалась на увеличении количества эмолина и хризофанол, но не повлияла на содержание фисциона. В то же время продолжительное освещение культуры подавляло образование антраценпроизводных. Благодаря регулярному отбору при пересадках желтых участков каллуса удалось увеличить содержание антраценпроизводных в культуре. Суспензионная культура *Morinda lucida* (сем. *Rubiaceae*) в зависимости от условий выращивания антрагликозиды или филлохинон, имеющих общего предшественника – О-сукцинилбензойную кислоту. В темноте накапливались антрагликозиды, но не синтезировался филлохинон. Наоборот, на свету клетки культуры ткани синтезировали филлохинон при полном отсутствии антраценпроизводных. Таким образом, поскольку образование филлохинона связано с формированием хлоропластов, свет является обязательным условием для его синтеза. В темноте, по-видимому вследствие освобождения предшественника, происходила переориентация культивируемых *in vitro* клеток на синтез антрагликозидов. В культуре ткани *Cassia tora* идентифицированы хризофанол, эмолин, фисцион. Их суммарная массовая доля равнялась 0,33 % от сырой биомассы, что больше, чем в семенах этого растения. Культура ткани *Rheum palmatum*, также как и *C. tora*, была способна к синтезу

мономерных антрахинонов, но не накапливала димерные производные. Однако в культуре ткани устойчивого гибрида *R. palmatum* и *R. coreanum* кроме мономерных антрапроизводных хризофанола (0,47 %), фисциона (0,4 %), эмодаина (0,7 %), реин-8-глюкозида (0,09 %) были обнаружены димерные производные – сеннозиды А и В. Их массовая доля в каллусе отдельных штаммов достигла 0,0083 % и 0,004 % соответственно.

Незаменимую роль играют культуры ткани продуцентов различных групп антраценопроизводных для исследования путей их биосинтеза. Известно, что ряд производных, например эмодин, образуются ацетатмалонатным путем. Синтез антраценпроизводных, в частности растений сем. *Rubiaceae*, идет через шикимовую кислоту. Опыты с мечеными предшественниками в культуре ткани *Morinda citrifolia* подтвердили, что антрагликозид мориндон и ализарин образуются из шикимовой, глутаминовой и мевалоновой кислот, а не ацетат-малонатным путем.

**Флавоноиды.** В культурах тканей могут синтезироваться флавоноиды различной степени окисленности. Установлено, что накопление этих соединений в культуре ткани, как и в интактных растениях, является светозависимым. Так, в культурах тканей *Crataegus monogina*, *C. oxyacantha*, *Ginko biloba* и др. образование проантоцианидинов и катехинов наблюдалось только на свету. В подвергнутых освещению каллусных культурах чая многократно усиливался синтез флаванов – олигомерных и димерных проантоцианидинов, (-)-эпикатехина и лейкоантоцианидина. Сравнительное исследование культур тканей чайного растения и паренхимных клеток листьев и стеблей взрослого растения показало, что существенным отличием культивируемых в темноте каллусов от клеток чайного растения является отсутствие в них хлоропластов. В связи с тем, что хлоропласты являются одним из важнейших центров биосинтеза фенольных соединений в зеленых клетках интактных растений, снижение интенсивности образования полифенолов и объединение спектра фенольных соединений в темновой каллусной культуре, возможно, объясняется этих органелл.

Сравнение строения паренхимных клеток интактных тканей листа и стебля чайного растения и полученных из них каллусных культур свидетельствует о наличии корреляции между степенью развития ультраструктуры пластид и способностью последних к синтезу фенольных соединений. Это еще раз подтверждает важную роль хлоропластов в синтезе фенольных соединений.

Биосинтез флавоноидов индуцировался УФ лучами, причем отмечалась линейная зависимость между дозой УФ облучения и количеством синтезируемых флавоноидов. Поскольку флавоноиды поглощают свет в интервале длин волн 200–380 нм, есть предположение, что одной из функций флавоноидов является защита растений от повреждающего действия УФ облучения. Экспериментальное подтверждение этому было получено в работе с культурой ткани *Rosa damascena*. Облучая культуру ткани этого растения постепенно повышающимися дозами УФ света ( $\lambda_{\text{max}} = 254$  нм), авторы получили штамм, устойчивый к УФ свету и содержащий в 14 раз больше флавоноидов, чем исходный.

Некоторые культуры тканей характеризуются потерей способности к биосинтезу флавоноидов, свойственным интактным растениям, что, вероятнее всего, обусловлено различной активностью соответствующих ферментных систем. Так, различные органы *Uncaria alliptica* (сем. *Rubiaceae*) содержат рутин и (-)-эпикатехин, которые используются в медицинской практике некоторых стран в качестве капилляроукрепляющих препаратов. Культура ткани *U. alliptica*, полученная в качестве экспериментальной системы контролируемого синтеза этих двух фармацевтически ценных флавоноидов, накапливала только (-)-эпикатехин, но не способна была к синтезу рутина. Максимальное содержание (-)-эпикатехина (0,5 % от массы сухой ткани) было ниже, чем в листьях и молодых стеблях растения (0,9–3,8 %), но сравнимо с его содержанием в старых стеблях (0,3–0,5 %). При этом также, как и во многих других флавоноидсодержащих культурах, синтез (-)-эпикатехина стимулировался светом. В культуре ткани *Stevia rebaudiana* был

идентифицирован рутин, его выход при выделении составил 22,4 мг на 3 кг биомассы. В процессе изучения культуры ткани *Chrysosplenium americanum* накапливала характерные для интактных растений О-метилованные флавоноловые гликозиды. Их содержание в сравнении с растением было невысоким, но постепенно увеличивалось по мере субкультивирования каллусов.

Несколько патентов, принадлежащих фирмам «Ajinomoto Co. Inc.» и «Meito Sangyo Co. Ltd.», связано с получением антоцианидинов из культур тканей *Polygonum tinctorium* и *Vitis sp.* Из 180 г свежей биомассы *Vitis sp.*, полученной в ферментере, был выделен 161 мг антоциановых пигментов, свет стимулировал их выход.

Формированию флавоноидов в культурах тканей предшествует повышение активности ферментов, участвующих в биосинтезе этих соединений. Большое внимание в изучении активности ферментов фенилпропанового ряда уделяется фенилаланинаммиаклиазе – ферменту, участвующему в образовании ароматических соединений. Модельной системой в этих исследованиях служила культура ткани петрушки *Petroselinum hortense*. Под воздействием эта культура способна синтезировать более 20 флавоновых и флавоноловых гликозидов. Агликонами этих гликозидов являются флавоны – апигенин, лютеолин – и флавонолы – кемпферол, кверцетин, изорамнетин. В процессе изучения энзимологии биосинтеза флавоноидов с помощью суспензионной культуры клеток *P. hortense* удалось найти почти все ферменты для синтеза флавоногликозида малонилапиина.

Дубильные вещества (таниды). Для изучения накопления танидов в культуре ткани были исследованы *Juniperus communis*, виды *Crataegus* и др. Гидролизуемые и конденсированные дубильные вещества обнаружены в культуре ткани можжевельника, где они накапливались в отдельных клетках или группах клеток. Культура ткани *Opobrychie vicifolia* проявила способность к синтезу конденсированных танинов. Культура ткани *Cornus officinalis* (сем. *Cornaceae*), способная синтезировать гидролизуемые т конденсированные таниды, использовалась для изучения биосинтеза полифенолов с большей молекулярной массой. Из этой культуры была выделена смесь галлотаннинов, состоящая из три-, тетра- и пентагаллоилглюкозы. Содержание главного танида 1, 2, 3, 6-тетрагаллоилглюкозы в культуре ткани было в 36 раз больше, чем в плодах, и в 12 раз больше, чем в листьях интактного растения, и составляло 12,98 мг на 1 г сухой биомассы (в плодах и листьях – 0,41 и 1,23 мг соответственно).

Лигнаны. Попытки найти продуцент с цитотоксической активностью привели к получению культуры ткани индийского подофилла *Podophyllum hexandrum* (сем. *Barberidaceae*). Известно, что корневища с корнями *P. hexandrum* и других видов подофилла содержат лигнаны, обладающие противоопухолевыми свойствами, из которых наиболее активным является подофиллотоксин. Его содержание в подземных органах составляет 4,3 %. Поскольку подофиллотоксин очень токсичен, его обычно используют для химического синтеза менее токсичных противоопухолевых препаратов (этопозид, тенипозид). Культура ткани *P. hexandrum* накапливает до 0,1 % подофиллотоксина причем каллусная культура отличается морфологической неоднородностью – темно-коричневые клетки культуры накапливают 0,3 % подофиллотоксина, а светлые, зеленеющие клетки частично или полностью теряют способность к синтезу лигнанов.

Кумарины и фурукумарины. Биосинтез производных  $\alpha$ -пиронов *in vitro* изучался на культурах тканей *Ruta graveolens*, *Nicotiana tabacum*, *Hydrangea macrophylla* и др. Клеточные культуры *R. graveolens* наряду с фурухинолиновыми алкалоидами накапливали кумарины и фурукумарины умбеллиферон, скополетин, псорален, ксантотоксин, изопимпинеллин, рутакультин и др., из них изопимпинеллин и рутакультин не свойственны данному растению. Культура ткани растения *Rutaceae Boenninghausenia albiflora*, как и культура ткани *R. graveolens* была способна к синтезу фурухинолинолиновых и акридоновых алкалоидов, а также кумаринов и фурукумаринов, характерных для растений *Boenninghausenia*, а также новых для рода кумаринов –

рутакультина и хелиеттина. Гидрангенол и умбеллиферон выделены из каллуса *H. macrophylla*. Из этой же культуры, суспензированной в 10 л культуральной среды, получено 150 мг скиммина через 3 недели культивирования и 110 мг кристаллического филлодульцина из 1,5 кг сырой биомассы клеток, культивировавшихся в ферментере.

#### Терпеноиды

Моно- и дитерпеноиды. Получение культур тканей, способных в условиях *in vitro* синтезировать эфирное масло, является трудной задачей. Известно небольшое число культур, ткани которых способны накапливать эфирное масло. Причины неудачных попыток обнаружить эфирные масла в культивируемых тканях (лимон, авокадо) связаны, прежде всего, с отсутствием в тканях морфологических структур, с которыми связано накопление эфирного масла. Известно, что эфирное масло образуется в специальных секреторных образованиях – выделительных клетках, железках, вместилищах, канальцах. Необычность условия культивирования тканей и клеток *in vitro* приводит к неполной реализации генетических возможностей клетки и недостаточному развитию этих структур. Однако известны случаи, когда образование эфирного масла в культуре происходит в неспециализированных структурах. Так, при выращивании на свету корневой ткани руты душистой, на поверхности каллуса образовались секреторные вместилища, в которых накапливалось эфирное масло. При выращивании этой ткани в темноте секреторные вместилища на поверхности каллуса встречались редко, а присутствие эфирного масла обнаруживалось в особых клетках (маслоклетках) паренхимного типа, расположенных группами в глубине ткани. Другим примером сохранения клетками культуры ткани способности к синтезу эфирного масла при отсутствии специализированных вместилищ является культура ткани пузырьков перикарпия и эндокарпия плодов лимона. Культура ткани розы эфирномасличной была получена с целью исследований путей биосинтеза эфирного масла в растении. У этого растения в отличие от многих других эфирносов не обнаружено специализированных структур для накопления эфирного масла. Его накопление происходит в клетках эпидермиса лепестков цветка. Культуры ткани розы, полученные из лепестков, чашелистиков и листа розы синтезировали эфирное масло, близкое по составу маслу органов целого растения, от которых культуры были получены. Содержание эфирного масла из культуры ткани лепестков соответствовало его содержанию в лепестках интактного растения (0,007–0,09 %). Основными компонентами розового масла являются монотерпеноиды линалоол, цитронеллол, гераниол, нерол,  $\beta$ -фенилэтиловый спирт и воска. Фотохимическое исследование эфирного масла из культуры ткани *Matricaria chamomilla* показало, что по составу оно отличается от масла из цветков интактного растения и от масла из листьев, полученных *in vitro*. Purohit, Khanna исследовали 24-месячную культуру ткани *Ocimum basilicum*. Максимальное содержание эфирного масла в этой культуре было получено при выращивании в условиях освещения – 0,046 % от массы сырой ткани. Эфирное масло состояло из линалоола (42 %) и метилхевикола (58 %). Количество эфирного масла в клетках культуры ткани *Perilla frutescens* было таким же, как и в интактном растении (0,1 % от сырой массы). В качестве главного компонента эфирного масла был идентифицирован лимонен, его концентрация в масле равна 1 %, за ним по содержанию следовали  $\alpha$ -пинен и линалоол. Пиретрины синтезировались в культуре ткани *Chrysanthemum cinerariasfolium*, их содержание увеличивалось в процессе дифференцировки тканей. Культивируемые клетки *Tripterygium wilfordii* накапливали противоопухолевые дитерпены и триптидиол, причем в больших количествах, чем растения. Моно- и дитерпены обнаружены в клеточных культурах *Thuja occidentalis* (сем. Cupressaceae): монотерпеноиды типа ментона накапливаются только в культуральной среде, а дитерпены найдены также и в клетках культуры ткани. По составу терпеноидов клеточные культуры и листья растения значительно отличаются между собой. Культура тканей накапливала соединения, которые отсутствовали в составе растения, и в то же время была неспособна синтезировать терпеноиды типа туйона. Культура ткани *Pinus*

*radiata* накапливала монотерпеноиды, причем продукты ее биосинтеза отличались от таковых, синтезируемых родительскими растениями: в качестве главной составной части вместо  $\beta$ -пинена, характерного для растения, синтезировался  $\alpha$ -пинен (87–100 %). Наиболее продуктивные линии накапливали  $2 \cdot 10^{-3}$  % монотерпеноидов в свежей биомассе, что составляло 20–40 % от их содержания в стеблях и иглах растений. Состав масла зависел от светового режима. При культивировании в темноте в тканях накапливались толуол и ацетон.

**Сесквитерпеноиды.** Имеются данные, что суспензионные культуры *Valeriana wallichii* и *Fedia cornucopiae* способны к синтезу валэпотриатов. Биорегуляторы, специально синтезированные для усиления активности ферментов, регулирующих образование терпеноидов, диметилпиридина хлорид и диметилморфолина бромид, значительно увеличили (на 15–50 %) содержание валэпотриатов – до 2,26 % в культуре ткани *F. cornucopiae* и до 1,9 % - *V. wallichii*. Биосинтез сесквитерпеноидов изучался с помощью культуры клеток *Andrographis paniculata* путем введения  $^{13}\text{C}$ -предшественников. Установлено, что интактное растение и культуры тканей, полученные из различных частей этого растения, синтезируют совершенно разные вторичные метаболиты. Обнаруженные пути биосинтеза в культуре ткани представляют интерес для изучения биогенеза терпеноидных соединений.

**Сердечные гликозиды.** Основным сырьем для промышленного получения сердечных гликозидов являются виды *Digitalis*. Культуры тканей этих видов изучались в различных лабораториях мира, но в большинстве культур не удалось обнаружить карденолидов. Однако биосинтез дигитоксина и пурпуреогликозида А наблюдался при органогенезе в культуре ткани. Содержание карденолидов в эмбриоидах, возникших в каллусе, достигало 0,15 мкг на 1 мг биомассы. Это свидетельствует о важности структурной дифференцировки для биосинтеза карденолидов.

Большой интерес представляют исследования, посвященные биотрансформации сердечных гликозидов различными клеточными культурами. Свойство культур тканей превращать (трансформировать) некоторые соединения, добавленные в питательную среду, в ценные фармакологически активные вещества, обусловлено значительным биохимическим потенциалом клеток, высокой активностью ферментных систем. Изучение биотрансформации малоиспользуемого в терапии сердечного гликозида дигитоксина в ценные гликозиды (дигоксин, пурпуреогликозид А и др.) проводилось на клеточных линиях *Digitalis*. Высокий выход конечных продуктов был достигнут при селекции специализированных линий и оптимизации условий роста в специальных аппаратах.

Высокоэффективный двухстадийный процесс биотрансформации дигитоксина был разработан для клеток *Digitalis lanata*. После 10-дневной инкубации клеток *Digitalis lanata* в «ростовой» питательной среде (Мурасига и Скуга) культуру переносили в «продукционную» среду (8 % раствор глюкозы) с субстратом для биотрансформации – дигитоксином. В этих условиях весь дигитоксин в течение 2 дней трансформировался в деацетиллантозид С (88 %) и пурпургликозид А (12 %).

В литературе имеются сведения о биотрансформации дигитоксигенина культурами тканей *Strophantus gratus*, *S. amboensis*, *S. intermedius*, дигитоксина – клетками *D. purpurea*, прегненолона и прогестерона – *N. tabacum* и *Sophora angustifolia* и др. Подробно была изучена способность к биотрансформации дигитоксигенина суспензионной культурой *S. Intermedius*, выделены и идентифицированы продукты превращений – 3-эпидигитоксигенин, 3-эпи-17-ан-дигитоксигенин, периплогенин, гитоксигенин, 3-эпигитоксигенин, 3-эпипериплогенин, дигитоксигенина- $\beta$ -D-глюкозид. Реакции биотрансформации молекулы дигитоксигенина различными культурами представлены в табл. 3.

Эти результаты свидетельствуют о том, что реакции окисления и эпимеризации 3 $\beta$ -гидроксила, 5 $\beta$ -гидроксилирования и глюкозилирования являются характерными, общими для многих культур. В то же время реакции 1 $\beta$ -, 4 $\beta$ -, 12 $\beta$ - и 16 $\beta$ -гидроксилирования и

изомеризации  $17\beta$ -лактонного кольца, вероятно, зависят от происхождения ткани и условий трансформации.

В настоящее время разработаны промышленные способы получения ценных карденолидов, основанные на иммобилизации растительных клеток *Digitalis* в специальных биокатализаторах.

Таблица 3

Реакции биотрансформации дигитоксигенина клетками культур тканей

Культура ткани	Окисление ( $3\beta$ -ОН-3-кето)	Эпимеризация ( $3\beta$ -ОН- $3\alpha$ -ОН)	Гидроксилирование (1 – 4 – 5 – 12 – 16)					Глюкозилирование	Изомеризация ( $17\beta \rightarrow 17\alpha$ -лактонное кольцо)
			$1\beta$	$4\beta$	$5\beta$	$12\beta$	$16\beta$		
<i>Digitalis lanata</i>	+					+		+	
<i>D. purpurea</i>	+	+			+			+	
<i>Thevetia neriifolia</i>	+							+	
<i>Daucus carota</i>					+				
<i>Strophantus gratus</i>		+	+	+	+				+
<i>S. amboensis</i>		+			+				
<i>S. intermedia</i>	+				+		+	+	+

Стероидные сапонины. Из культур тканей выделено более 50 различных стероидных соединений:  $\beta$ -ситостерин, стигмастерин, диосгенин, холестерин, тигогенин, 24-метилхолестерин и др. Виды диоскореи интенсивно изучаются в культуре ткани как возможные продуценты стероидных сапонинов. Диосгенин, представляющий интерес в качестве исходного вещества для производства гормональных препаратов, выделен из культур тканей видов *Dioscorea*, *D. deltoidea*, *D. tokoro*, *D. composita*, *D. floribunda*, *Solanum xanthocarpum*, *S. laciniatum* и др. Содержание диосгенина в культурах тканей в зависимости от происхождения и условий культивирования различно: 1,33 % в культуре ткани клубневого происхождения *D. floribunda*, 3,8 % в культуре ткани *D. deltoidea*, росшей в хемостате.

В настоящее время наметился переход к промышленным способам культивирования тканей *D. deltoidea*. Скорость роста этой культуры в ферментере достигала 0,55 г/л в день, максимальная продуктивность по содержанию диосгенина – 12 мг на 1 л среды за день в случае двухстадийного процесса (7,8 % от массы сухой ткани). В сумме сапонины, выделенные из каллусных тканей *D. deltoidea*, обладали фармакологической активностью, аналогичной активности стероидных сапонинов из интактного растения. Работы ученых с культурами тканей, продуцирующими стероиды, внесли большой вклад в изучение биосинтеза этих соединений. Используя меченые предшественники ( $^{14}\text{C}$ -ацетат,  $^{14}\text{C}$ -мевалоновую кислоту,  $^{14}\text{C}$ -2, 3-оксидосквален, 4- $^{14}\text{C}$ -холестерин и др.) было установлено, что ключевым предшественником сапонинов является циклоартенол, а также то, что гидроксилированию кольца А в биосинтезе йоногенина и токорогенина предшествует гидроксилирование боковой цепочки холестерина. В результате таких исследований предложена следующая последовательность биосинтеза стероидных сапонинов: мевалонат-циклоартенол-холестерин-3, 16, 26-тригидроксихолест-5-ан-3, 16, 22, 26-тетрагидроксихолест-5-ен-диосгенин (йоногенин)-токорогенин.

Тритерпеновые сапонины. Женьшень *Panax ginseng*, культура ткани которого была получена в 1958 г., оказался в СССР первым растением, биомассу которого начали выращивать в промышленных условиях в качестве принципиально нового источника сырья. Промышленному производству предшествовало фитохимическое изучение культуры ткани женьшеня, проведенное Ленинградским химико-фармацевтическим институтом в творческом содружестве с институтом физиологии растений им. А.К. Тимирязева и ВНИИ «Биотехника». Фитохимическое изучение культуры ткани женьшеня

показало наличие тритерпеновых сапонинов, характерных для взрослого растения. Кроме сапонинов биомасса женьшеня характеризуется наличием моно- и дисахаридов, пектиновых веществ, крахмала, альбуминов,  $\beta$ -ситостерина, различных микроэлементов и др.

Содержание «сырого» сапонины (суммарная гликозидная фракция) в биомассе женьшеня (5,9 %) не уступало таковому в корне растения. Гликозиды, обнаруженные в культуре ткани, близки панаксозидам корня женьшеня. Японские исследователи выделили сапонины в чистом виде и идентифицировали их как панаксодиол, панаксотриол, гинзенгозиды Rb<sub>1</sub> и Rg<sub>1</sub>, олеаноловую кислоту. Содержание «чистого» сапонины в культуре ткани по их данным составляет 0,11 % от сырой биомассы (2,16 % от сухой биомассы), что значительно превышает продуктивность природного корня (0,09 % от массы свежего корня и 0,53 % - от массы высушенных корней). Препараты, полученные из биомассы женьшеня, обладают тонизирующим и адаптогенным действием, не уступающим по эффекту препаратам из корня растения.

Культура ткани другого растения сем. *Araliaceae* полисциаса папоротниколистного *Polyscias filicifolia* по своему химическому составу близка к биомассе женьшеня. В то же время у нее выявлен ряд дополнительных ценных качеств: настойка из биомассы полисциаса обладает иммуностимулирующим и антитерагенным действием. Из других культур тканей, содержащих тритерпеновые сапонины, следует отметить такие виды солодки, как *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis*, *G. echinata*.

Каротиноиды. Есть данные, свидетельствующие об образовании в культуре тканей. Так, в культуре ткани *Solanum laciniatum* обнаружены  $\beta$ -каротин, криптоксантин, зеаксантин и лютеалин, но их количество в 1000 раз меньше, чем в органах целого растения. Такое же низкое содержание каротиноидов характерно и для других культур. Отмечено стимулирующее влияние света на увеличение содержания каротиноидов в культуре ткани.

Алкалоиды являются наиболее многочисленной группой вторичных продуктов, изучаемых в культуре ткани. Исследования ведутся главным образом в 2 направлениях:

✓ поиск культур тканей – продуцентов противоопухолевых, сердечно-сосудистых и других дефицитных и дорогостоящих веществ, синтезируемых исключительно в растительной клетке, и отработка условий выращивания, позволяющих получать значительную массу сырья с высоким содержанием искомого продукта;

✓ изучение механизма различных групп алкалоидов.

Из продуцентов изохинолиновых алкалоидов следует отметить виды *Papaver*. В культурах тканей рода *Papaver* доминируют алкалоиды протопинового, бензофенантридинового и тетрагидропротоберберинового типов и практически отсутствуют алкалоиды морфинановой группы, характерные для растений этого рода. Штаммы культуры ткани *Papaver bracteatum* полученные в Институте физиологии им. К.А. Тимирязева, не содержали тебаина, но синтезировали сангвинарин, не характерный для целого растения. Его содержание в зависимости от штамма колебалось 0,5–2,7 %. Штамм *Papaver bracteatum*, исследуемый Хуком с соавт. также был неспособен к синтезу тебаина. В нем были идентифицированы в небольших количествах алкалоиды сангвинарин и оксисангвинарин, а основным алкалоидом, продуцируемым клетками культуры, был дигидросангвинарин. Его содержание в суспензионной культуре достигало 1 % от сухой биомассы или 178 мг на 1 л культуры за 21 день выращивания.

Культура ткани близкого вида *Papaver somniferum* была способна синтезировать алкалоиды наркотин, кодеин, морфин, папаверин, протопин, сангвинарин, причем около 90 % алкалоидов выделялось в среду 2830 мкг на 1л среды. После обработки такой культуры элиситром (гомогенат *Botrytis sp.*) Tyler с соавт. наблюдали увеличение содержания сангвинарина и дигидросангвинарина в ней до 3 % от сухой массы клеток (65,4 мг на 100 мл культуры).

В качестве принципиально нового источника сырья – продуцента сангвинарина недавно предложена культура ткани *Sanguinaria canadensis*. Канадская компания «Vipont Pharmaceutical», специализирующаяся на производстве зубных паст, совместно с «Fort Collins» разработала способ получения терапевтической добавки, которая войдет в состав нового антикариесного лекарственного средства. Добавка содержит сангвинарин, выделяемый *S. canadensis*. Суспензионная культура *Eschscholtzia californica* так же, как исходное растение, накапливала изохинолиновые алкалоиды. производные бензофенантридина, но в виде дигидропроизводных – дигидросангвинарин, дигидрохелирубин, дигидрохелеритрин и др. Наибольшее содержание приходится на долю дигидрохелирубина – 1,7 % от массы сухих клеток, что в 4–8 раз выше, чем в растении. Условия *in vitro* оказались весьма благоприятными для накопления берберина – алкалоида, используемого в медицинской практике в качестве желчегонного средства при хроническом гепатите, гепатохолецистите, желчекаменной болезни. На сегодняшний день берберинсодержащие культуры ткани – это одни из немногих алкалоидсодержащих культур, имеющие высокую продуктивность, значительно превышающую продуктивность естественного сырья – продуцента берберина (корни *Coptis japonica*, кора *Phellodendron amurense*, трава *Thalictrum minus* и др.). Каллусы берберинсодержащих растений имеют желтую окраску и флуоресцируют в УФ свете. На этих свойствах была основана селекционная работа с клетками *Coptis japonica*. Благодаря неоднократному отбору клетки *C. japonica* в оптимальных условиях (отсутствие света, аэрирование питательной среды Уайта, содержащей 3 % сахарозы) накапливали в среднем 8,2 % берберина от массы сухой ткани (0,9 г на 1 л среды), а наивысшее содержание берберина в отобраных клетках составило 13,2 % (1,39 г на 1 л среды). Это в 2,5 раза больше, чем в корнях взрослого, 5–6 летнего растения. К настоящему времени, благодаря усилиям японских исследователей, получены штаммы *C. japonica*, способные в суспензионной культуре в течение 14 дней синтезировать около 1,5 г берберина в 1 л питательной среды. Другой продуцент берберина – культуру ткани *T. minus* выращивали в специальном биореакторе. Клетки культуры, иммобилизованные на шариках альгината кальция, синтезировали берберин, большая часть которого переходила в среду и кристаллизовалась. Скорость синтеза берберина (50 мг/л в день) позволила получить в биореакторе к концу цикла выращивания 2,4 г алкалоида на 1 л среды (141 мг на 1 л сухой массы клеток). При сравнении вышеуказанных продуцентов берберина – *C. japonica* и *T. minus* – отмечены существенные различия между этими двумя культурами. Культура ткани *C. japonica* накапливает берберин, а в случае культуры ткани *T. minus* алкалоид мигрирует в питательную среду, где в силу своей высокой концентрации осаждается на стенках культуральных сосудов в виде желтых кристаллов. Кроме того, сумма алкалоидов культуры клеток *T. minus* на 95–99 % состоит из берберина, что, по-видимому, экономически выгодней для использования в промышленных целях. Культура ткани *C. japonica* содержит по крайней мере 5 алкалоидов протоберберинового типа. Из них на долю берберина приходится 55–57 %.

Виды *Colchicum* являются источником сырья алкалоидов колхицина и колхамина, включенных и фармакопее многих стран. С целью создания биотехнологической системы для синтеза колхицина была получена суспензионная культура *Colchicum autumnale*. Содержание колхицина в ней было в 10 раз меньшим, чем в клубнях интактного растения (240–400 мкг/г). Добавки к среде биогенетического предшественника колхицина – алкалоида демекольцина способствовали увеличению содержания колхицина до 116 мг на 1 г сырой биомассы.

*Peganum harmala* как источник хиназолиновых и индольных алкалоидов издавна привлекала к себе внимание специалистов. Подробное исследование каллусной ткани *P. harmala* было проведено в 1971–1980 гг. В результате идентифицированы характерные для интактного растения алкалоиды гармин и гармалин и их фенольные производные гармол и гармалол. Однако содержание алкалоидов было более, чем в 20 раз меньше по сравнению с

интактными растениями. Продуктивнее оказались клеточные линии, отселектированные в результате скрининга большого числа культур. Содержание алкалоидов в них превышало 2 %. Интересными представляются данные, полученные Barz с соавт. Авторы установили строгую зависимость синтеза алкалоидов в клетках гармалы от типа углеродного питания; в фотосинтезирующих культурах алкалоиды не синтезировались, но их биосинтез восстанавливался в культурах с гетеротрофным типом питания (т.е. при введении сахарозы в состав питательной среды).

Каллусные культуры *Cephaelis ipescacuanha* были способны синтезировать индольные алкалоиды, характерные для корней интактного растения, эметин и цефаелин. Изменение состава питательной среды оказало влияние на количество алкалоидов в тканях. Максимальный выход эметина и цефаэлина был равен 0,346 и 0,93 % соответственно (в корнях растения их содержание равно 1,28 % и 0,53 % соответственно). Следует отметить, что во всех опытных тканях в отличие от интактных растений содержание цефаелина в культуре ткани было больше, чем эметина.

Еще один источник индольных алкалоидов *Tabernaemontana divaricata* (сем. *Aprocynaceae*) в культуре клеток синтезирует значительное число алкалоидов: перивин, вобазин, воафиллин, аппарин, коронаридин и др. Содержание главного алкалоида воафиллина достигало своего максимума на 19 день ростового цикла (23 мг/л), после чего алкалоид быстро метаболизировался. Идентифицированные в культуре алкалоиды – коринатин, ибога, плюмерин и аспидоспермин – принадлежат к различным классам. При выращивании клеток на свету содержание алкалоидов увеличивалось в 2 раза. Из другого вида *Tabernaemontana elegans*, в сырой биомассе которого содержится 0,004 % алкалоидов, также выделен ряд индольных алкалоидов, принадлежащих к классу коринантина и аспидоспермина. Алкалоиды типа ибога не были обнаружены.

корневая и стеблевая культуры ткани *Ruta graveolens*, характеризующиеся высоким уровнем дифференциации, сохраняли почти полностью алкалоидный состав, свойственный органам интактного растения. Как известно, в корнях и надземных частях руты синтезируются хинолиновые (производные фурухинолина, фенилхинолина и др.) и акридиновые алкалоиды (производные 1-гидрокси-N-метилакридина, рутакридона). Со снижением уровня дифференциации биосинтетическая активность клеток руты не исчезает, как это часто наблюдается у других культур. Недифференцированная ткань и суспензионная культура содержат меньший набор алкалоидов, но в ней доминирует биосинтез рутакридона, содержание которого достигает 1,5–2,0 %, что в 20 раз выше, чем в растении. Суспензионная культура ткани данного растения успешно росла в многолитровых барботажных реакторах, сохраняя преобладающий биосинтез рутакридона. Интересно отметить, что наряду с фурухинолиновыми алкалоидами ткани *R. graveolens* в культуре накапливают кумарины и фурукумарины.

Терапевтические свойства близкого, но не менее известного вида *Boenninghausenia albiflora*, также обусловлены наличием фурухинолиновых и акридоновых алкалоидов и кумаринов. В культуре ткани этого растения были идентифицированы кумарины, фурукумарины, алкалоиды рутакридон и его глюкозид гравакридондиола (0,01 и 0,03 % соответственно). Алкалоид норакроницин, типичный для интактного растения, не был обнаружен.

Алкалоидный спектр культуры ткани *Catharanthus roseus* состоит главным образом из оснований типа коринантина, главными из которых являются серпентин и аймалицин. Суспензионная культура успешно прошла испытания в многолитровых биореакторах. Расчеты, проведенные Фаулером Н.Б., свидетельствуют об экономической эффективности производства серпентина из суспензионной культуры катарантуса. Выход биомассы, полученной в ферментере вместимостью 20 м<sup>3</sup> за 10 суток цикла выращивания равен 25 г/л при содержании серпентина в клетках не менее 1 % от сухой массы. Это позволяет получить 5 кг веществ за 1 цикл, а в течение года (30 циклов) – около 150 кг.

Димерные алкалоиды винбластин и винкрестин, эффективные в терапии злокачественных заболеваний крови, в культуре ткани катарантуса не обнаружены, или отмечены в незначительном количестве. Попытки селекции высокопродуктивных линий *C. roseus* оказались неудачными вследствие нестабильности таких культур. Катарантин, непосредственный предшественник винбластина, накапливается в культуре в количестве, превышающем в 5 раз его содержание в растении.

В Ленинградском химико-фармацевтическом институте на основе изучения культуры ткани раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* и дальнейшей ее селекции был создан ряд штаммов и клеточных линий, которые в последнее время культивируются с целью получения высококачественного сырья – продуцента алкалоидов. В культуре ткани раувольфии накапливаются преимущественно алкалоиды группы индолина и индоленина, из которых наиболее известным является аймалин, обладающий выраженным противоаритмическим действием. В суспензионной культуре, изученной Стокайтом И. с соавт., аймалин содержится в незначительном количестве – 0,007 %. Штаммы полученные в ЛХФИ, характеризуются высоким содержанием аймалина – более 1 %. Следует отметить, что в культуре ткани раувольфии синтезируется ряд алкалоидов, не обнаруженных в интактном растении раувольфии змеиной – вомиленин, перакин, 17-0-ацетилаймалин, 17-0-ацетилнораймалин и винорин, причем содержание вомиленина в суспензионной культуре ткани раувольфии змеиной, по данным Стокайта И., в 51 раз превышало таковое в близком виде *R. vomitoria*, а в штаммах, полученных в ЛХФИ, содержание этого алкалоида было в 2,5–4 раза больше, чем в суспензионной культуре. Кроме того в культуре ткани раувольфии змеиной недавно обнаружен глюкоалкалоид раукаффрицин (вомиленин- $\beta$ -D-глюкопиранозид), не характерный для этого растения, а встречающийся исключительно в *R. caffra*. Его содержание в клетках культуры ткани раувольфии змеиной после оптимизации питательной среды достигало 1,6 г/л (1,95 % от сухой биомассы). Это в 12–15 раз больше, чем в интактном растении *R. caffra*.

Резерпин – самый распространенный алкалоид в растениях рода раувольфия – практически отсутствовал в высокоаймалинных штаммах. Способ его индукции в клетках раувольфии змеиной описан в японском патенте. Концентрация резерпина в суспензионной культуре при выращивании в указанных патентом условиях, достигала 0,06 % от массы сухих клеток.

Под руководством Строкайта И. проведен комплекс исследований по биосинтезу алкалоидов раувольфии и катарантуса. В 1978 г. данной группой исследователей был идентифицирован глюкоалкалоид стриктозидин как предшественник биосинтеза многих индольных алкалоидов, затем описана реакция его образования путем конденсации триптамина и секологанина, катализируемая стриктозидин-синтетазой. Добавление секологанина к среде стимулировало накопление аймалицина и серпетина в суспензионной культуре *C. roseus*. Их содержание увеличивалось почти в 20 раз на среде с высокой концентрацией сахарозы.

Из суспензионной культуры клеток раувольфии змеиной была выделена виноринсинтетаза – фермент, осуществляющий переход алкалоидов группы сарпагина в аймалиновую. Введение радиоактивного винорина в клетки позволило сделать вывод о том, что винорин является непосредственным предшественником биосинтеза алкалоидов группы аймалина.

В последние годы с помощью суспензионной культуры *R. serpentina* изучены почти все биосинтетические ступени, ведущие к алкалоидам типа аймалина и сарпагина и охарактеризованы ферменты, участвующие в этом процессе.

Клетки *Solanum laciniatum*, одного из продуцентов стероидных алкалоидов, сохраняли способность к специфическим биосинтезам в условиях *in vitro*. Так же, как и растение, суспензионная культура паслена синтезировала стероидный алкалоид соласодин и его тригликозид соласонин, но в отличие от растения не накапливала стероидный

сапогенин диосгенин. Другие стероидные соединения представлены в основном ланостерином и в меньшей степени стигмастерином,  $\beta$ -ситостерином и холестеринном.

**Витамины.** Всестороннее исследование различных культур тканей позволило установить способность некоторых из них к синтезу витаминов. Выше описана способность культуры ткани *Nicotina tabacum* к синтезу убихинона-10. Его содержание в клетках (0,036 %) в 10 раз больше, чем в листьях табака (0,003 %).

Культура ткани *Cytisus scorpius* содержала больше пиридоксина (витамин В<sub>6</sub>), чем растение. Во многих культурах был обнаружен биотин. Особенно высокое его содержание (в 15 раз больше, чем в растении) отмечено в культуре ткани *Lavandula vera*. Аскорбиновая кислота (13 мг на 100 г сырой ткани) накапливалась в культуре ткани *Rosa rugosa*. В несколько раз увеличивалось ее содержание при выращивании ткани на свету (38 мг), но все-таки было меньше, чем в плодах шиповника. В культуральной среде, вероятно, в связи с его быстрым окислением витамин С не накапливался.

Вышеперечисленным не ограничивается биосинтетическая способность культур тканей. Есть сведения о синтезе в культуре ткани лигнина (*Lactuca sativa*, *Pinus strobus*, *Populus nigra* и др.), смолистых веществ (*Pinus ailvestris*, *Rauwolfia serpentina*). Тканевые культуры *Linum usitatissimum*, *Daucus carota*, *Hydnocarpus authelmentica*, *Phassolus awans* и др. характеризовались содержанием липидов и жирных кислот, набор которых часто отличался от состава жирных кислот исходного растения. Липиды культур тканей содержат обычно распространенные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с длиной цепи 16 и 18 углеродных атомов. Основной насыщенной жирной кислотой пальмитиновая кислота, ненасыщенными жирными кислотами – линолевая и линоленовая.

Культуры тканей растений, накапливающие вторичные продукты в больших количествах, чем целые растения, скорее исключение, чем правило. Большинство продуктов, имеющих высокую себестоимость, таких, как сердечные гликозиды, алкалоиды опия (морфин, кодеин, папаверин и др.), противоопухолевые алкалоиды (винкристин, винбластин), некоторые алкалоиды раувольфии (резерпин), эфирные масла, пестициды и др. либо не накапливаются в культуре ткани, либо обнаруживаются в незначительных количествах. Оценка приемов регуляции биосинтеза вторичных метаболитов, апробированных в многолетней практике культивирования растительных клеток показывает, что в том случае, когда образование ценных метаболитов коррелирует с формированием в растениях специализированных тканевых структур (эфирномасляничные вместилища, млечники и т.д.), то реализация его по полной программе при недифференцированном росте растительных клеток маловероятна. В таких случаях, по-видимому, более целесообразных структур (побеги, корни, эмбриониды).

## **6. Основы слияния растительных клеток**

Как уже отмечалось выше, основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток, т.е. слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Слияние клеток может быть полным или клетка-реципиент может приобрести отдельные части клетки-донора (цитоплазму, митохондрии, хлоропласты, ядерный геном или его крупные блоки). Введение небольших блоков генетической информации обычно осуществляется методами генетической инженерии. При этом следует помнить, что природа допускает лишь строго определенное сочетание родительских форм.

Слиянию клеток предшествует установление тесного контакта между их плазматическими мембранами. Этому, как правило, препятствует наличие на природных мембранах поверхностного заряда, обусловленного отрицательно заряженными группами белков и липидов. Деполяризация мембран переменным электрическим или магнитным полем, нейтрализация отрицательного заряда мембран с помощью катионитов способствует слиянию клеток. На практике для этой цели широко используют ионы кальция. Эффективным «сливающим» агентом также служит полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В случае животных клеток в качестве «сливающего» агента, кроме ПЭГ, также используют вирус Сендай. Его действие как «сливающего» агента, по-видимому, связано с частичным гидролизом белков цитоплазматической мембраны.

Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки, получая при этом протопласты. Чаще всего клеточную стенку подвергают ферментативному гидролизу, применяя лизоцим (для бактериальных клеток), зимолиазу улитки (для грибных клеток), комплекс целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ, продуцируемых микроскопическими грибами (для клеток растений).

Набухание и последующее разрушение протопластов предотвращается за счет создания повышенной осмомолярности среды. Подбор гидролитических ферментов и концентраций солей в среде с целью обеспечения максимального выхода протопластов представляет собой сложную задачу, которая в каждом случае решается индивидуально.

С целью скрининга полученных гибридных клеток используют различные подходы:

- ✓ учет фенотипических признаков;
- ✓ создание селективных условий, в которых выживают лишь гибриды, объединившие геномы родительских клеток.

Метод слияния соматических клеток открывает перед биотехнологией значительные перспективы. Основоположниками данного направления биотехнологии являются Глеба Ю.Ю. и Сытник К.М. (1982, 1984 гг.).

Выделяют несколько вариантов слияния гибридных клеток.

1. Возможность скрещивания филогенетически отдаленных форм живого. В результате слияния клеток растений получены плодовые, фенотипически нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом, петунии, а также стерильные межвидовые гибриды картофеля и томата, табака и белладонны. Кроме того, получены клеточные гибриды между представителями различных семейств (табака и гороха, табака и сои; и т.п.), хотя лишь, как неорганизованно растущие клетки. Получены межвидовые и межродовые гибриды дрожжей, а также имеются данные о слиянии клеток разных видов грибов и бактерий.

2. Получение ассиметричных гибридов, несущих полный набор генов одного из родителей и частичный набор другого родителя. Чаще всего такие гибриды возникают при слиянии клеток организмов, генетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильных делений клеток, обусловленных некоординированным поведением двух разнородных наборов хромосом, в ряду поколений частично или полностью теряются хромосомы одного из родителей. Ассиметричные гибриды, как правило, бывают устойчивее, плодovitее и жизнеспособнее, чем симметричные, т.е. несущие полный набор генов обеих родительских клеток. В целях ассиметричной гибридизации возможна избирательная обработка клеток одного из родителей для разрушения части его хромосом. Кроме того, возможен прицельный перенос нужной хромосомы из клетки в клетку. Также представляет интерес получение клеток, у которых гибридной является только цитоплазма. Цитоплазматические гибриды образуются в том случае, когда после слияния клеток, ядра сохраняют свою анатомию и при последующем делении гибридной клетки оказываются в разных дочерних клетках. Скрининг таких клеток проводится по генам-маркерам ядерного и цитоплазматических геномов. Клетки со слившейся цитоплазмой, но не ядрами, содержат ядерный геном одного из родителей и, в то же время, совмещают цитоплазматические гены слившихся клеток.

3. Получение гибридов путем слияния трех или более родительских клеток. На основе таких гибридных клеток могут быть выращены растения (грибы)-регенераты.

4. Гибридизация клеток, несущих различные программы развития. Такая гибридизация возможна в случае слияния клеток различных тканей или органов, а также слияния нормальных клеток с клетками, программа развития которых изменена в результате злокачественного перерождения. В этом случае получают, так называемые

гибридомные клетки (гибридомы), наследующие от нормальной родительской клетки способность к синтезу того или иного полезного соединения, а от злокачественной – способность к быстрому и неограниченному росту.

Приведем некоторые интересные примеры практической гибридизации.

Широкое распространение в США и Англии получил гибридный сорт помидоров, устойчивый к двум вирусам (PLRV и PVY), наносящих наибольший вред этим растениям. Данный гибридный сорт создали в результате слияния протопластов дикого вида помидора *S. brevidens*, устойчивого к этим вирусам, и коммерческого сорта помидора *S. tuberosum*. Кроме того, в Японии создан сорт помидоров, устойчивый к высоким температурам.

Значительный прогресс в данной области исследований произошел благодаря искусственным ассоциациям растительных клеток с микроорганизмами, особенно с азотфиксирующими бактериями. Проблема придания растениям свойств азотфиксации имеет огромное народнохозяйственное значение, т.к. производство азотных удобрений связано с большими экономическими затратами, а их использование с загрязнением окружающей среды. Так, в настоящее время получены положительные результаты благодаря искусственным ассоциациям азотфиксирующей бактерии *Anabaena variabilis* и табака.

Технология культивирования клеток в условиях *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 находятся только на стадии поиска.

Успешно проводятся исследования по созданию ассоциаций клеток различных организмов (смешанных культур клеток двух или более организмов) с целью получения искусственных симбиозов, т.е. выгодного для партнеров сожительства. Примерами естественных симбиозов служат лишайники, объединяющие в своем составе клетки гриба и водоросли (или цианобактерии), система «инфузории – цианобактерии», в которой последние живут в цитоплазме инфузории и обеспечивают ее кислородом, ассоциация папоротника и цианобактерии, обеспечивающей папоротник азотом, ассимилированным из воздуха. Кроме того, проведены успешные опыты по введению азотфиксирующей бактерии (*A. variabilis*) в клетки табака. Данные опыты имеют очень большое практическое значение, т.к. в связи с большими экономическими затратами на производство азотных удобрений в последние годы обсуждается вопрос о создании культурных растений, связывающих атмосферный азот. Один из разрабатываемых путей является создание симбиозов растений и азотфиксирующих цианобактерий. Попытка ввести цианобактерию *A. variabilis* непосредственно в черенки зрелых растений табака не увенчались успехом. Однако при совместном культивировании клеток мезофильной ткани листа табака и цианобактерий удалось получить растение-регенерат, содержащее цианобактерии. По результатам электронной микроскопии, цианобактерии располагаются на поверхности листа и стебля, а также проникают вглубь устьиц листа и сосудистой системы стебля и ассимилируют азот из атмосферы. Кроме того, получены ассоциации клеток женьшеня и паслена дольчатого с цианобактерией. Под влиянием цианобактерий в клетках паслена активизируется синтез гликоалкалоидов.

## **7. Взаимосвязь генетической и клеточной инженерии**

Клеточная инженерия представляет собой эффективный способ модификации биообъектов, позволяющих создавать новые ценные продуценты БАВ, как на организменном, так и на тканевом и клеточном уровнях. Современная клеточная инженерия позволила обратить на пользу человека способность раковых клеток к неограниченному росту, превратив их в гибридомы, представляющие собой живые

фабрики важнейших продуктов, в первую очередь, моноклональных антител. В сравнении с генетической инженерией для клеточной биотехнологии характерен более крупномасштабный характер транспорта информации между живыми организмами. Клеточная инженерия позволяет вводить в клетку целые геномы (ядерный, хлоропластный, митохондриальный), в то время, как генетическая инженерия в основном нацелена на передачу индивидуальных генов. В то же время, клеточная биотехнология уступает генетической инженерии по уровню «интеллектуальной проработки» исследований: генно-инженерные разработки позволяют прицельно передать строго определенный ген от донора к реципиенту, в то время, как применение клеточной инженерии связано со значительной неопределенностью в судьбе хромосом, ядер в целом, цитоплазмы и ее органелл, как в процессе слияния клеток, так и при последующем культивировании клеток (гибридов). В этой связи центр тяжести разработок в области клеточной инженерии приходится на скрининг клеточных популяций для выявления клеток с ценными свойствами.

Несмотря на очевидные успехи клеточной инженерии, все же в последнее время наибольший интерес вызывают работы по целенаправленному изменению свойств сельскохозяйственных растений с помощью методов генетической инженерии, т.е. конструирования и переноса генов в растительные клетки или в целые растения. В последние годы с появлением генно-инженерных методов клонирования генов и их переноса в растительные клетки, а затем и в регенерируемые из них растения, стало возможным более быстрое создание новых сортов. Данное направление, зародившееся лишь в середине 80-х гг. XX в., быстро набирает темп. Так, изолированно множество генов растений и микроорганизмов, кодирующих признаки продуктивности, устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Кроме того, получено и немало растений, содержащих такие гены. Растения, несущие в геноме чужеродные гены, называемые трансгенными, постепенно внедряются в сельскохозяйственную практику, и их вклад в производство сельскохозяйственной продукции быстро растет.

Одним из методических приемов переноса генов состоит в использовании патогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, которая содержит *Ti*-плазмиду, ответственную за индукцию опухолей у двудольных растений. Технология введения чужеродных генов в данную плазмиду и последующее заражение растений агробактерией с измененной *Ti*-плазмидой на сегодняшний день наиболее хорошо отработана. Различают 2 подхода переноса генов в клетки растения:

- 1) гены вводят в изолированные клетки, лишенные полисахаридных стенок, называемые протопластами, и затем из этих клеток регенерируют целое растение;
- 2) используют бактерию *A. tumefaciens*, способную заражать растительные клетки и переносить в них часть плазмиды (*Ti*-плазмиды) вместе с любой содержащейся в ней чужеродной ДНК.

Растения – важнейший источник питания, в принципе обеспечивающий потребности человека и животных набором тех соединений, которые клетки животных и человека не синтезируют сами. К таким соединениям относятся: незаменимые аминокислоты, многие витамины и т.п. Вместе с тем основные виды растений, используемых в пищу, неполноценны, т.е. дефицитны (для животных) по некоторым аминокислотам. В этой связи в такие растительные корма необходимо ввести такие аминокислоты, как лизин, треонин, триптофан. Для сбалансирования растительных кормов налажено специализированное крупномасштабное микробиологическое промышленное производство данных аминокислот, однако решение этой проблемы нельзя еще считать окончательным. Генетическая инженерия позволяет кардинально упростить ее решение. В настоящее время выделены гены белков картофеля (пататин), фасоли (фазолин), гороха (легумин), кукурузы (зеин), составляющие основу кормов. Многие из этих генов удалось

перенести в растения, что позволило увеличить в них содержание дефицитных аминокислот.

Другая идея заключается в использовании искусственно (химически) синтезированных генов, кодирующих в большом количестве незаменимые аминокислоты. Такие эксперименты уже проводят с картофелем для повышения содержания в нем ценных аминокислот.

Следующее направление генно-инженерных работ – создание гербицидоустойчивых ценных видов культурных растений. Традиционные методы селекции с целью создания сортов, устойчивых к гербицидам, очень продолжительны и малорезультативны. В этой связи большие надежды также возлагают на методы генетической инженерии. Так, осуществлен успешный перенос гена устойчивости к гербицидам у *Streptomyces* в клетки сахарной свеклы. В результате регенерированные из них растения приобрели устойчивость к гербициду фосфинотрициану. Таким путем удалось получить устойчивые к гербицидам растения табака.

Еще одной областью применения генетической инженерии является улучшение лёжкости плодов и овощей в процессе хранения. Установлено, что в размягчении плодов томатов при их хранении, ухудшающем их потребительские качества, участвует фермент полигалактуронидаза (ПГУ). В этой связи возникает необходимость в подавлении активности данного фермента. Методом генетической инженерии сконструирован ген, транскрипция которого приводит к образованию вместо природной мРНК фермента анти-мРНК. В результате в клетках растения, в которое перенесен искусственно созданный ген, накапливается анти-мРНК, ингибирующая природную мРНК. Механизм подавления мРНК ПГУ в клетках томатов заключается в следующем: накапливающиеся в клетках молекулы анти-ПГУ мРНК вступают в комплекс с мРНК ПГУ, в результате чего последние не в состоянии транслироваться. Анти-мРНК в данном случае действует подобно антителам, активизирующим антигены. В результате этой сложной, но успешно проведенной работы был получен новый сорт томатов с улучшенными свойствами, а именно способностью более продолжительное время не размягчаться при хранении. Следует отметить, что данный сорт был получен всего за один сезон.

Кроме того, спомощью методов генетической инженерии был создан инсектицидоустойчивый трансгенный хлопчатник. Для этого в геном обычного хлопчатника был введен ген ингибитора трипсина коровьего гороха, продукт которого подавляет активность протеаз в пищеварительной системе насекомых. Вследствие того, что известны многие токсины, продуцируемые микроорганизмами, эффективно убивающие разные виды насекомых, то в настоящее время гены этих токсинов используют с целью создания, например, трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку.

Учеными также предпринимаются попытки получения растений, устойчивых к вирусам, наносящим огромный урон сельскому хозяйству. Спектр вирусов, инфицирующих сельскохозяйственные растения, очень велик. Наиболее перспективным способом защиты растений от вирусов считают индуцирование растениям «иммунитета» к вирусам методом, сходным с иммунизацией. Так, ген белка оболочки вируса табачной мозаики перенесли в клетки табака и получили трансгенные растения, у которых 0,1 % всех белков листьев представлен вирусным белком. Значительная часть таких растений при инфицировании вирусом не проявляла никаких симптомов заболевания. Молекулярный механизм подавления вирусной инфекции пока неясен. Существует несколько предположений. Полагают, что синтезирующийся в клетках белок оболочки вируса мешает вирусной РНК нормально функционировать и формировать полноценные вирусные частицы. В ближайшем будущем планируют получить вирусорезистентные зерновые культуры.

Проводятся эксперименты по созданию растений, устойчивых к заболеваниям, благодаря переносу в них вирусных генов в антисмысловой ориентации, т.е. анти – РНК

вируса. Один из подходов повышения устойчивости растений к вирусам, не связанный с генетической инженерией, основан на культивировании вирусов табачной и томатной мозаики и вирусов цитрусовых в специальных условиях (обработка азотной кислотой, повышение температуры), в результате чего они утрачивают патогенность. Такие ослабленные вирусы служат своеобразной вакциной для растений.

Перенос генов в растения может быть с успехом использован и для создания новых интересных форм в цветоводстве. С помощью генно-инженерных подходов получена трансгенная петунья с белыми цветами.

Генетическая инженерия стремится изменить генетические свойства не только растений, но и микроорганизмов, ассоциированных с ними. Растения получают из почвы лишь незначительную часть содержащегося в ней азота. Некоторые из них снабжают азотом симбиотические бактерии, которые живут в анаэробных условиях в клубеньках, образуемых на корневых волосках. За связывание атмосферного азота у азотфиксирующих клубеньковых бактерий рода *Rizobium* ответственны гены *nif*. Их перенос в генетический аппарат растений решил бы важнейшую агробιοтехнологическую задачу. Однако в настоящее время удалось реализовать несколько иной подход, который позволяет усилить азотфиксирующие свойства симбионта донника путем увеличения в нем числа *nif*-генов.

Разработаны подходы для получения морозоустойчивых растений, основанные на генно-инженерных манипуляциях с *Pseudomonas* и некоторыми растениями. Бактерии рода *Pseudomonas* содержат белок, ускоряющий кристаллизацию льда. В том случае, когда из бактерий удаляют ген, ответственный за синтез этого белка, то получают штамм, называемый «лед-минус». Данный штамм «лед-минус», распыленный над клубнями картофеля, конкурирует с обычными бактериями, что, в конечном счете, приводит к повышению морозоустойчивости растений.

Все это – еще не готовые производственные биотехнологии, а лишь подготовка базы для их создания. Существует 2 тесно взаимосвязанных варианта будущего биотехнологического производства ценных продуктов из растений: культивирование целых растений и культивирование клеток. Методы культивирования растительных клеток в питательных средах создали самостоятельную отрасль биотехнологического производства ценных продуктов. Если культуру получают из одной клетки, то все вновь выросшие клетки будут генетически идентичны и образуют клон. Такие клоны интенсивно размножающихся клеток, как и бактериальные культуры, – хорошие продуценты ценных растительных продуктов. Их производительность и экономичность зачастую значительно выше, чем у целых растений. В данном случае, как и при работе с бактериями, можно использовать клетки, которые в растениях производят необходимый продукт, или можно целенаправленно изменить клетку с помощью методов генетической инженерии, сделав ее ценным продуцентом целевого продукта. В производстве уже используются клеточные культуры следующих природных продуцентов: культуру клеток табака, производящие убихинон-10 (витамин), культуру клеток барбариса, продуцирующую ятроноризин (спазмолитическое лекарственное средство), клетки воробейника, производящие шиконин (лекарственное средство для лечения ран, ожогов, геморроя). Однако промышленное производство данных культур, за исключением, например, продуцентов шиконина, пока экономически не выгодно. Требуется дальнейшее усовершенствование технологии культивирования клеток и повышения их продуктивности.

Область клеточных биотехнологий в ближайшем будущем, после того как реализует свои возможности генетическая инженерия, станет важнейшим источником ценных продуктов. Сначала будут получены трансгенные растения, а затем на их основе – высокопродуктивные культуры клеток. Так, трансгенные растения рапса, в которые введены гены лей-энкефалина и других нейропептидов человека, соединенные с частью гена альбумина семян, продуцируют около 1 мг ценного рекомбинантного белка на 1 т

семян. По оценкам представителей фирмы, создавших трансгенный рапс, с 1 га можно будет получать около 3 кг нейропептидов.

Обсуждая в 1989 г. на страницах журнала «Trends in Biotechnology» перспективы использования биотехнологии в разных сферах сельскохозяйственного производства, сотрудники Федерального института в Цюрихе Н. Гоч и П. Ридер пишут о значении таких направлений, как клонирование и перенос в растения новых генов, ответственных за устойчивость к заболеваниям, контролирующим образование метаболитов, важных с экономической точки зрения. Предполагается, что в ближайшем будущем будет проведено картирование генов большинства используемых в сельском хозяйстве одно- и двудольных растений и реализован искусственный перенос в них дополнительных генов. Перспективы успешного переноса генов, ответственных за фиксацию молекулярного азота, пока оцениваются невысоко из-за трудности решения этой проблемы. На данном этапе исследований повышение эффективности фиксации азота за счет симбиотических и несимбиотических микроорганизмов представляется весьма реальным.

Говоря о быстром прогрессе в области генетической инженерии растений, следует обратить внимание на то, что в самое последнее время возникло и ширится движение экологов, в частности «зеленых», против генно-инженерных работ с растениями. Они опасаются, что растения, которым придана устойчивость к гербицидам, могут быстро распространиться в природе с непредсказуемыми последствиями для культурных растений. Эти опасения небезосновательны, поэтому можно ожидать, что генетическая инженерия растений будет преимущественно развиваться в направлении их биотехнологического использования. Основное внимание будет уделено культивированию клеток растений, которые продуцируют ценные продукты, а не созданию сортов полевых растений, устойчивых к химическим и биологическим вредителям. Это не относится к созданию растений, устойчивых к экстремальным условиям окружающей среды, т.к. размножение соле-, засухо- и морозоустойчивых растений в любом случае будет полезным. В настоящее время проводятся работы по строгому контролю процессу опыления, которые в случае успеха помогут снять ряд существующих опасностей. В некоторых лабораториях пытаются получить растения с неактивной пылью (мужская стерильность) для того, чтобы исключить распространение пыльцы трансгенных растений.