

Занятие семинарского типа № 2

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Совершенствование биообъектов – продуцентов витаминных препаратов традиционными методами селекции и с помощью методов генетической и клеточной инженерии

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Совершенствование биологических объектов – продуцентов биологически активных веществ

Повышение продуктивности микроорганизма как продуцента биологически активных веществ (БАВ), в том числе и витаминов, в основном сводится к селекции и мутагенезу. Селекционная работа с микроорганизмом состоит в поиске природных форм, обладающих полезными для человека свойствами (биосинтез БАВ, высокая скорость роста, способность усваивать доступные субстраты и т.д.), в дальнейшем его совершенствовании, в создании на его основе производственных (технологических) штаммов.

Методы современной селекции состоят в генетическом конструировании, когда можно изменить генетическую программу микроорганизма.

Генетическое конструирование в живой клетке *in vivo* включает получение и выделение мутантов с использованием разных способов обмена наследственной информацией живых микробных клеток.

Генетическое конструирование *in vitro* основано на применении генетической инженерии, которая манипулирует выделенной из организма ДНК.

Каждый организм имеет свой генотип и фенотип. Биотехнолог для совершенствования биологического объекта использует:

- ✓ наследственные изменения фенотипа, которое передается по наследству;
- ✓ наследственное изменение генотипа.

В целом совершенствование биологического объекта заключается в получении биообъектов (продуцентов БАВ) с определенными мутациями в геноме, которые отличаются от исходного («дикого») штамма в сторону улучшения биотехнологических свойств, в частности, в плане увеличения образования целевого продукта.

Отбору высокопроизводительных штаммов предшествуют тонкие манипуляции селекционера с генетическим материалом исходных диких штаммов. При этом используют весь спектр естественных способов рекомбинации генов, известных у бактерий: конъюгацию, трансдукцию, трансформацию и другие генетические процессы. Так, например, конъюгация была успешно использована при создании штамма *Pseudomonas putida*, способного утилизировать углеводороды нефти. Часто прибегают к трансдукции (перенос гена

из одной бактерии в другую посредством бактериофагов) и амплификации (увеличение числа копий нужного гена).

Еще один подход в генетико-селекционной работе – получение генетических рекомбинантов путем слияния разных штаммов бактерий, лишенных клеточных стенок (протопластов). Слияние протопластов позволяет объединять генетические материалы микроорганизмов, которые в естественных условиях не скрещиваются.

К основным целям, которые необходимо достигать биотехнологу при совершенствовании продуцента БАВ, в том числе и витаминов, относятся:

1. Увеличение продуктивности в достижении большого выхода лекарственных веществ на единицу биомассы.

2. Придание продуценту способности использовать менее дефицитные и более доступные в экономическом отношении питательные среды.

3. Продуцент не должен ретроингибировать биосинтез конечного продукта.

4. Устойчивость продуцента к вирусным инфекциям (бактериофагам).

5. Нетребовательность к оборудованию, т.е. биосинтез не должен снижаться при несовременной технологии оборудования (например, достижение меньшей вспениваемости культуральной жидкости).

6. Оптимизация свойств продуцента в аспекте фармацевтическом производстве (продуцент не должен иметь неприятного запаха и т.п.).

В этой связи, главным тезисом биотехнолога, прежде всего, является увеличение выхода целевого продукта на единицу биомассы продуцента.

2. Совершенствование биологических объектов с помощью методов селекции

Первоначально основу селекции составлял искусственный отбор: отбор человеком растения или животных с нужными (ценными) для него признаками. До XVI–XVII вв. отбор в основном осуществлялся бессознательно, например, человек отбирал для посева лучшие, наиболее крупные семена пшеницы, не задумываясь о том, что он изменяет растения в нужном ему направлении.

Только в последнее столетие человек, еще не зная законов генетики, стал использовать отбор сознательно или целенаправленно, скрещивая те растения, которые удовлетворяли его в наибольшей степени.

Однако, следует отметить, что, используя только метод отбора человек не может получить принципиально новые свойства у селекционируемых организмов (растений, животных, микроорганизмов), т.к. в результате отбора можно выделить только генотипы, уже существующие в популяции. В этой связи, для получения новых пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов применяют гибридизацию, скрещивая растения с необходимыми признаками и в дальнейшем отбирая из полученного потомства особи, у которых полезные свойства выражены в большей степени. Так, напри-

мер, один сорт пшеницы отличается прочным стеблем, устойчив к полеганию, а сорт с тонкой соломиной не подвержен заражению стеблевой ржавчиной. При скрещивании растений двух сортов в потомстве возникают различные комбинации признаков. Однако, отбирают те растения, которые имеют одновременно прочную соломину и устойчивы к заражению стеблевой ржавчиной. Это один из классических путей создания нового сорта.

Характеристика методов селекции

- СЕЛЕКЦИЯ**
1. наука о методах создания новых сортов и гибридов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов с нужными для человека признаками;
 2. направленный отбор мутантов, т.е. организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение вследствие структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК;
 3. отрасль сельскохозяйственного производства, занимающаяся выведением новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур, пород животных.

Генеральный путь селекции – это путь от слепого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов.

Теоретической основой селекции является генетика, т.к. именно знание законов генетики позволяет целенаправленно управлять появлением новых мутаций, прогнозировать результаты различных скрещиваний, правильно проводить отбор полученных гибридов. В результате применения знаний по генетике удалось создать более 10000 сортов пшеницы на основе нескольких исходных диких сортов, получить новые штаммы микроорганизмов, являющихся продуцентами ценных БАВ: пищевые белков, лекарственных веществ (антибиотиков, витаминов, ферментов, аминокислот и т.п.).

Предмет селекции состоит в изучении и претворении на практике специфических закономерностей эволюции культурных растений, сельскохозяйственных животных и искусственных штаммов.

К задачам современной селекции относятся:

1. Создание новых и совершенствование старых сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов с хозяйственно-полезными признаками.
2. Создание технологичных высокопродуктивных биологических систем, максимально использующих сырьевые и энергетические ресурсы планеты.
3. Повышение продуктивности пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов с единицы площади за единицу времени.
4. Повышение потребительских качеств продукции.
5. Уменьшение количества побочных продуктов и их комплексная переработка.

6. Уменьшение количества потерь от вредителей и болезней.

К традиционным методам селекции относят: отбор, гибридизацию и мутагенез.

Методы	Селекция
1.Подбор родительских форм	осуществляют по ценным признакам или по экстерьеру
2.Гибридизация	аутбридинг, инбридинг и др.
3.Отбор	единичный, индивидуальный, систематический (методический), массовый
4.Мутагенез	естественные и спонтанные мутации
5.Испытание производителей потомству	по метод искусственного осеменения

Отбор. Различают естественный и искусственный отбора.

Естественный отбор – основной движущий фактор эволюции. Учение о естественном отборе создано Ч. Дарвином (1858–1859 гг.).

Естественный отбор – результат борьбы за существование, выражающийся в преимущественном выживании и оставлении потомства наиболее приспособленными особями каждого вида организмов, и гибели менее приспособленных особей. Необходимой предпосылкой для его действия является наследственная изменчивость организмов, а его непосредственным результатом – формирование приспособлений организмов к конкретным условиям внешней среды. Следствиями естественного отбора являются увеличение разнообразия форм организмов, последовательное усложнение организации в ходе прогрессивной эволюции и вымирание менее приспособленных видов.

Искусственный отбор – отбор, проводимый человеком, состоящий в выбраковке особей, не представляющих ценности в хозяйственной деятельности и в оставлении для потомства особей с ценными признаками.

Бессознательный искусственный отбор – отбор, при котором человек, отбирая особей для потомства, не ставит перед собой задачи изменить данный организм в каком-либо направлении, а лишь учитывает определенные его качества, необходимые для улучшения хозяйственной деятельности.

Целевой (сознательный) отбор – отбор, проводимый селекционерами, состоящий в том, что он осуществляется в соответствии с определенной, заранее поставленной целью, когда свойства организмов корректируются в определенном направлении.

Различают следующие виды целевого отбора:

✓ единичный отбор – отбор, проводимый однократно из определенной группы особей;

✓ методический (систематический) отбор – отбор, проводимый в течение нескольких поколений с целью выведения форм организма, в наибольшей степени отвечающих нуждам человека;

✓ индивидуальный отбор – отбор на уровне конкретных особей данной породы животных или сортов растений. При данном виде отбора (по генотипу) получают и оценивают потомство каждого отдельного растения в ряду поколений при обязательном контроле наследования признаков, интересующих селекционера. В результате индивидуального отбора увеличивается число гомозигот, т.е. полученное поколение становится генетически однородным. Данный отбор обычно применяют среди самоопыляемых растений (пшеницы, ячменя и др.) для получения чистых линий, представляющих ценный исходный материал для селекции;

✓ массовый отбор – отбор потомства большого числа особей одновременно. В частности, из всей популяции злаковых культур того или иного сорта для дальнейшего размножения оставляют только растения, отличающиеся устойчивостью к возбудителям болезней и полеганию, имеют крупный колос с большим числом колосков и т.д. При их повторном посеве снова отбирают растения с необходимыми качествами. Сорт растения, полученный данным способом, генетически однороден, и отбор периодически повторяют. К основным достоинствам этого метода относятся: техническая простота, экономичность и возможность сравнительно быстро улучшить местные сорта. В тоже время, его основной недостаток состоит в невозможности индивидуальной оценки по потомству, в силу чего результаты отбора неустойчивы.

В селекции используют все перечисленные виды отбора. Однако, отбор сам по себе не дает результата, если у организмов не будут возникать определенные изменения. Изменения сами по себе возникают медленно, стихийно и не всегда в нужных направлениях, поэтому селекционеры используют воздействия на организм, инициируя возникновение целевых изменений.

Гибридизация (скрещивания) заключается в том, что получают потомство от особей, различающихся определенными признаками, которые можно использовать в дальнейшей селекционной работе. Гибридизация позволяет в некоторой степени нарушать консерватизм наследственности, что способствует селекционной работе.

Различают близкородственную, неродственную и отдаленную гибридизацию.

Близкородственной гибридизацией (инбридингом) называют скрещивание, в котором участвуют близкородственные организмы. Инбридинг используют для получения «чистых линий», в которых свойства, присущие данному сорту растений, породе животных или штамму микроорганизмов, выделяются в наиболее концентрированном виде. Подобное выделение целевого признака связано с тем, что генотип родственных организмов близок, а их скрещивание способствует возникновению гомозиготных форм. Следует отметить, что при инбридинге наблюдается гибридная депрессия – снижение

жизнеспособности и продуктивности вследствие близкородственного скрещивания. Получение «чистых линий» находит широкое применение в селекции, т.к. позволяет выявить свойства организмов, важные для хозяйственной деятельности, а затем использовать полученные формы в дальнейшей селекционной работе.

Неродственной гибридизацией называют скрещивание особей данного вида, принадлежащих к разным семьям.

Отдаленная гибридизация – скрещивание организмов, принадлежащих не только к разным породам, но и к разным видам.

Реализация межвидовой гибридизации возможна за счет полиплоидии – явления, при котором в клетке возникает набор хромосом, в кратное число раз больший, чем это характерно для нормы.

Мутагенез – искусственное получение мутаций с помощью мутагенов.

Термин «мутагенез» предложен голландским ученым де Фризом в 1901 г.

В селекционной практике мутагенез используют для получения перспективных мутантов животных, растений и микроорганизмов.

Мутант – наследственно измененная в результате мутации форма организма. Мутанты могут возникать спонтанно или под действием мутагенов. Большинство мутантов отличаются от исходных организмов нарушением различных структур и функций и, как правило, отличаются пониженной жизнеспособностью. Гораздо реже возникают мутанты, обладающие преимуществами, которые широко используют для выведения новых сортов растений, пород животных и получения штаммов микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ (БАВ). В генетике мутанты используют для изучения закономерностей мутационного процесса: строения и функционирования генетического аппарата, путей биосинтеза и т.п. Мутанты играют важную роль в эволюции, т.к. представляют собой материал для естественного отбора.

Мутации – внезапные, естественные или вызванные искусственно наследуемые изменения генетического материала, приводящие к изменению тех или иных признаков организма. Мутации могут быть обусловлены перестройкой репликона (изменением в нем числа и порядка расположения генов) или изменениями внутри индивидуального гена.

Классификация мутаций

Различают спонтанные мутации, возникающие с относительно низкими частотами, и индуцированные мутации, индуцируемые воздействием мутагенов.

Виды мутагенов:

К физическим мутагенам относят: нагревание, ионизирующие, ультрафиолетовое (УФ) и микроволновое излучения. Первичный эффект ионизи-

рующих и УФ излучений заключается в образовании одиночных или двойных разрывов в молекуле ДНК.

Мутагенным действием обладают многие химические соединения (алкилирующие соединения, нитрозосоединения, противоопухолевые антибиотики и др.). Химические мутагены классифицируют на: мутагены прямого действия, непосредственно взаимодействующие с генетическим материалом клетки, и мутагены непрямого действия, влияние которых на генетический материал клетки опосредованно, реализуется через ряд метаболических превращений. Однако, в отличие от ионизирующих и УФ излучений, для химических мутагенов свойственна специфичность действия, зависящая от природы объекта и стадии развития клетки. При взаимодействии химических мутагенов с компонентами наследственных структур возникают их первичные повреждения, приводящие к возникновению мутаций.

К биологическим мутагенам относят ДНК- и РНК-содержащие вирусы, некоторые полипептиды, белки, ряд рестриктаз и т.п. Механизм образования мутации в результате воздействия разных биологических факторов не вполне ясен. Однако, агенты, содержащие нуклеиновые кислоты, могут вызывать нарушение рекомбинации, приводящие к возникновению мутаций.

Механизм действия некоторых мутагенов

Ионизирующие излучения действуют на нуклеиновые кислоты непосредственно, ионизируя и активируя их атомы, приводя к разрывам углеводно-фосфатного остова молекулы и водородных связей между комплементарными нитями ДНК, образованию «сшивок» между этими нитями, разрушению азотистых оснований, особенно пиримидиновых.

Прямое действие ионизирующей радиации на хромосомы и содержащуюся в них ДНК обуславливает почти линейную зависимость между дозой облучения и частотой возникновения генных мутаций и нехваток (малых делеций). Для хромосомных перестроек (более крупные делеции, инверсии, транслокации и др.), возникающих в результате двух разрывов хромосомы, зависимость между дозой облучения и их частотой носит более сложный характер.

Мутагенное действие ионизирующих излучений может быть и косвенным, т.к. их прохождение через цитоплазму или питательную среду, в которой культивируются микроорганизмы, вызывает радиолиз воды, а, следовательно, образование свободных радикалов и перекисей, обладающих мутагенным действием.

Ультрафиолетовое излучение возбуждает электронные оболочки атомов, что вызывает разные химические реакции в нуклеиновых кислотах, приводящие к мутациям, из которых наибольшее значение имеют гидратация цитозина и образование димеров тимина, а также разрыв водородных связей между нитями ДНК и образование «сшивок» между этими нитями.

Однако, ультрафиолетовые лучи плохо проникают во внутренние ткани организма, поэтому их мутагенное действие проявляется только там, где они

могут достигнуть генетического аппарата (при облучении вирусов, бактерий, спор растений и т.п.).

Алкилирующие соединения. К их числу относятся наиболее сильные из известных мутагенов (супермутагены) такие, как нитрозозэтилмочевина, этилметансульфонат и др., алкилируют фосфатные группы нуклеиновых кислот, приводя к разрывам углеводно-фосфатного остова молекулы, а также азотистые основания (гуанин), в результате чего нарушается точность репликации нуклеиновых кислот, и, возникают транзиции (мутация замены оснований, когда одно пуриновое основание замещается на другое пуриновое основание (аденин на гуанин или наоборот) или пиримидиновое основание на другое пиримидиновое основание (тимин на цитозин или наоборот), и реже — трансверсии (мутация замены оснований, когда одно пуриновое основание замещается на пиримидиновое основание или наоборот).

Аналоги азотистых оснований включаются в нуклеиновые кислоты, что при последующей репликации приводит к появлению транзиций и трансверсий.

Эти же типы изменений вызываются азотистой кислотой, дезаминирующей азотистые основания.

Акридиновые красители образуют комплекс с ДНК, мешающий её репликации, в результате выпадают или добавочно вставляются одна или несколько пар нуклеотидов, что приводит к сдвигу рамки считывания.

Аналогичные типы реакций с нуклеиновыми кислотами характеризуют и другие химические мутагены. Однако, для многих из них механизм мутагенеза изучен недостаточно.

Некоторые мутагены нарушают цитоплазматический аппарат митоза, а, следствием этого является нерасхождение всех разделившихся хромосом или неправильность их распределения между дочерними клетками. При этом в первом случае возникает полиплоидия, во втором – анеуплоидия.

На ход мутагенеза значительное влияние оказывают различные внешние факторы. Так, частота мутаций, индуцируемых ионизирующими излучениями, возрастает при поступлении в клетку кислорода и уменьшается при его недостатке (в том случае, если облучение происходит в атмосфере азота).

При действии некоторых химических мутагенов мутации могут возникать сразу или спустя некоторое время, а иногда через несколько клеточных поколений.

Мутации называют прямыми, если их проявление приводит к отклонению признаков от дикого типа, и обратными мутациями (реверсиями), если их проявление приводит к полному или частичному восстановлению дикого типа.

Мутации бывают: генеративными (происходят в половых клетках и передаются следующим поколениям), соматическими (происходят в соматических клетках организма и наследуются только при вегетативном размножении), ядерными (затрагивают хромосомы ядра), цитоплазматическими (за-

трагивают генетический материал, заключенный в цитоплазматических органоидах клетки).

По характеру изменения генотипа различают следующие виды мутаций:

Генные мутации представляют наследственные, микроскопически не выявляемые изменения в хромосомах. Они сопряжены с заменой пары азотистых оснований в полинуклеотидной цепи ДНК или с вставкой, или выпадением отдельных нуклеотидов.

Хромосомные мутации (хромосомные абберации) классифицируют на: внутривхромосомные и межхромосомные. К внутривхромосомным мутациям относят: делецию (утрата части хромосомы), дупликацию (удвоение части хромосомы) и инверсию (изменение последовательности расположения генов по длине хромосомы за счет перевертывания (инверсии) участка хромосомы на 180°). К межхромосомным мутациям относят транслокацию (обмен участками между двумя и более хромосомами).

Геномные мутации заключаются в изменении числа хромосом. Увеличение числа хромосом, кратное гаплоидному набору хромосом, называют полиплоидией. Отсутствие или избыточное количество отдельных хромосом объединяют понятием анеуплоидия, которую подразделяют на гиперплоидию (увеличение числа хромосом) и гипоплоидию (потеря отдельных хромосом). Данные мутации возникают за счет повреждений в процессе мейоза, ведущих к нерасхождению хромосом или хроматид по дочерним клеткам.

Мутационный процесс у микроорганизмов можно использовать более эффективно, чем у высших организмов, т.к. их геном является гаплоидным, что позволяет выделять любые мутации уже в первом поколении. Кроме того, к преимуществам микроорганизмов как объектов биотехнологии относятся: простота генетической организации в сравнении с эукариотами, простота генетической регуляции, отсутствие или не столь сложное взаимодействие генов. В той связи, используя методы генетической инженерии можно заставить бактерии или другие группы микроорганизмов продуцировать те соединения, синтез которых в дикой природе был им несвойственен.

С точки зрения совершенствования биообъектов – продуцентов витаминов с помощью традиционных методов селекции следует подчеркнуть перспективность использования так называемого мутационно-ступенчатого отбора.

Мутосинтез и мутосинтоны представляют новое направление в создании новых лекарственных средств, базирующееся на использовании мутагенеза.

Выделяют три перспективных направления применения достижений селекции – селекция растений, животных и микроорганизмов. При этом третье направление – селекция микроорганизмов – способствует развитию такой сферы человеческой деятельности, как биотехнология.

Практическое значение селекции заключается в повышении продуктивности сельскохозяйственных животных, урожайности сельскохозяйственных растений и эффективности биотехнологических производств.

Направления селекционного процесса

Селекция растений представляет собой совокупность методов создания новых сортов и гибридов растений с ценными для человека свойствами, повышающими урожайность и качество культур.

К основным направлениям селекции растений относят:

- 1) Повышение урожайности сортов растений.
- 2) Улучшение качества продукции (вкуса, лежкости, внешнего вида овощей и фруктов, увеличения в химическом составе зерна белка, крахмала, аминокислот и т.п.).
- 3) Приобретение растениями необходимых физиологических качеств (засухоустойчивости, холодостойкости, скороспелости, устойчивости к вредителям и болезням).
- 4) Интенсификация развития (хороший отклик на введение удобрений, полив).

Селекцию растений реализуют с учетом потребностей рынка сбыта сельскохозяйственной продукции. К примеру, с целью выпечки качественного хлеба с мягкой внутренней частью и хрустящей коркой необходимы сильные (стекловидные) сорта мягкой пшеницы с повышенным содержанием эластичной клейковины и белка, для приготовления высших сортов печенья – мучнистые сорта мягкой пшеницы, макаронных изделий – сорта твердой пшеницы.

Развитие селекции растений основывается на законах генетики, т.к. качества живых организмов зависят от их генотипа и могут изменяться вследствие наследственной и модификационной изменчивости. В связи с этим, основу селекции составляет, прежде всего, генетика, а также достижения других научных дисциплин (цитологии, эмбриологии, систематики и географии растений, молекулярной биологии, биохимии и физиологии).

К основным методам селекции растений относятся: массовый и индивидуальный отбор, внутривидовая и отдаленная гибридизация, инбридинг, полиплоидия и мутагенез.

Для перекрестноопыляемых растений применяют массовый отбор особей с нужными свойствами. В противном случае невозможно получить материал для дальнейшего скрещивания. Таким путем получают, например, новые сорта ржи, не являющиеся генетически однородными. В случае, если необходимо получить чистые линии, т.е. генетически однородные сорта, то применяют индивидуальный отбор, при котором путем самоопыления получают потомство от одной единственной особи с необходимыми признаками. Данным методом были получены многие сорта пшеницы, капусты и т.д.

Для закрепления полезных наследственных свойств необходимо повысить гомозиготность нового сорта растения. В некоторых случаях для этого применяют самоопыление перекрестноопыляемых растений. При этом могут фенотипически проявиться неблагоприятные воздействия рецессивных генов. Основная причина этого – переход большинства генов в гомозиготное

состояние. У любого организма в генотипе постепенно накапливаются неблагоприятные мутантные гены. Они чаще всего рецессивны и фенотипически не проявляются. Однако, в процессе самоопыления они переходят в гомозиготное состояние, приводя к возникновению неблагоприятного наследственного изменения. В природе у самоопыляемых растений рецессивные мутантные гены быстро переходят в гомозиготное состояние, и такие растения погибают, выбраковываясь естественным отбором.

Несмотря на неблагоприятные последствия самоопыления, его часто применяют у перекрестноопыляемых растений для получения гомозиготных («чистых») линий с нужными признаками. Это приводит к снижению урожайности. Однако, проводя впоследствии перекрестное опыление между разными самоопыляющимися линиями, в результате в ряде случаев получают высокоурожайные гибриды, обладающие ценными для селекционера свойствами. Данный метод получил название метода межлинейной гибридизации. При его реализации часто наблюдается эффект гетерозиса: гибриды первого поколения обладают высокой урожайностью и устойчивостью к неблагоприятным воздействиям. Гетерозис характерен для гибридов первого поколения, которые получают при скрещивании не только разных линий, но и разных сортов и даже видов. Эффект гетерозиготной (или гибридной) мощности бывает сильным только в первом гибридном поколении, а в последующих поколениях постепенно снижается. Основная причина гетерозиса заключается в устранении в гибридах вредного проявления накопившихся рецессивных генов. Другая причина состоит в объединении в гибридах доминантных генов родительских особей и взаимного усиления их эффектов.

Следует отметить, что кукуруза стала первым растением, у которого получение высокопродуктивных гетерозисных гибридов было поставлено на промышленную основу. Валовые сборы зерна такого гибрида были на 20–30% выше, чем у родительских форм.

В селекции растений широко применяется экспериментальная полиплоидия, т.к. полиплоиды отличаются быстрым ростом, крупными размерами и высокой урожайностью. Кроме того, избыток хромосом повышает их устойчивость к патогенным организмам (вирусам, грибам, бактериям) и ряду других неблагоприятных факторов, в том числе и к ионизирующим излучениям: при повреждении одной или даже двух гомологичных хромосом аналогичные остаются неповрежденными. Полиплоидные особи, как правило, жизнеспособнее диплоидных. Так, в сельскохозяйственной практике широко используются: триплоидная сахарная свекла, четырехплоидный клевер, рожь и твердая пшеница, а также шестиплоидная мягкая пшеница.

Ценные результаты позволяет получить и использование в селекционной практике явления аллополиплоидии, основу которого составляет метод отдаленной гибридизации. Так, выведены межвидовые полиплоидные гибриды капусты и редьки, ржи и пшеницы. Гибридизация пшеницы (*Triticum*) и ржи (*Secale*) позволила получить ряд форм, объединенных общим названием тритикале. Они обладают высокой урожайностью пшеницы и зимостойкостью, и неприхотливостью ржи, устойчивостью ко многим болезням, в том

числе и к линейной ржавчине, являющейся одним из главных факторов, ограничивающих урожайность пшеницы. На основе гибридизации пшеницы и пырея российским академиком Н.В. Цициным получены пшенично-пырейные гибриды, отличающиеся высокой урожайностью и устойчивостью к полеганию.

Однако, отдаленные гибриды, как правило, бесплодны. Это связано с содержанием в геноме различных хромосом, которые в мейозе не конъюгируют. Для восстановления плодовитости у межвидовых гибридов в 1924 г. советский генетик Г.Д. Карпеченко предложил использовать у отдаленных гибридов удвоение числа хромосом, которое приводит к образованию амфидиплоидов.

Г.Д. Карпеченко проводил скрещивание редьки и капусты. Число хромосом у этих растений одинаково ($2n = 18$). Соответственно, их гаметы несут по 9 хромосом. Гибрид капусты и редьки имеет 18 хромосом, но он бесплоден, т.к. хромосомы этих растений в мейозе не конъюгируют, поэтому процесс образования гамет не может протекать нормально. В результате удвоения числа хромосом в бесплодном гибриде оказалось 36 хромосом, состоящих из двух полных диплоидных наборов редьки и капусты. Это создало нормальные возможности для мейоза: хромосомы капусты и хромосомы редьки конъюгировали между собой. Каждая гамета несла по одному гаплоидному набору редьки и капусты ($9 + 9 = 18$). В зиготе вновь оказалось 36 хромосом; межвидовой гибрид стал плодовитым. По фенотипу новый растительный организм совмещал признаки редьки и капусты, например, в строении стручка.

Получают искусственные полиплоиды, как правило, с использованием химических веществ, разрушающих веретено деления, в результате чего удвоившиеся хромосомы не могут разойтись, оставаясь в одном ядре. Одним из таких веществ является колхицин. Применение колхицина для получения искусственных полиплоидов является одним из примеров искусственного мутагенеза, применяемого в селекции растений.

В частности, в результате искусственного мутагенеза и последующего отбора мутантов были получены новые высокоурожайные сорта ячменя и пшеницы. Кроме того, данным путем удалось получить новые штаммы микроскопических грибов, синтезирующих в 20 раз больше антибиотиков, чем исходные «дикие» формы. В начале XXI в. в мире культивируют более 250 сортов сельскохозяйственных растений, созданных при помощи физического и химического мутагенеза. К ним относятся: сорта кукурузы, ячменя, сои, риса, томатов, подсолнечника, хлопчатника, декоративных растений и т.п.

При создании новых сортов растений с помощью искусственного мутагенеза исследователи используют закон гомологических рядов Н.И. Вавилова. Организм, получивший в результате мутации новые свойства, называют мутантом. Большинство мутантов имеют пониженную жизнеспособность и отсеиваются в процессе естественного отбора. Для эволюции или селекции новых пород животных и сортов растений необходимы те редкие особи, которые имеют благоприятные или нейтральные мутации.

В последние десятилетия во многих странах мира проводятся научные исследования по получению индуцированных мутантов. Так, например, индуцированные рентгеновыми лучами мутанты были выделены у многих злаковых культур (ячменя, пшеницы, ржи и др.). При этом они отличаются не только повышенной урожайностью, но и укороченным побегом. Такие растения устойчивы к полеганию и имеют заметные преимущества при машинной уборке. Кроме того, наличие короткой и прочной соломины позволяет осуществлять дальнейшую селекцию по увеличению размера колоса и массы семян без опасения, что повышение урожая зерна приведет к полеганию растений.

Выведение новых высокопродуктивных сортов растений имеет важное значение в повышении их урожайности и обеспечении населения продовольствием. За последние 100 лет усилиями селекционеров урожайность зерновых культур была повышена почти в 10 раз. В настоящее время в ряде стран получают рекордные урожаи (100 ц/га) риса, пшеницы, кукурузы и др.

Высококачественные сорта пшеницы созданы российскими селекционерами (Безостая-1, Аврора, Кавказ, Саратовская-29, Саратовская-36, Альбидум-43 и др.), отличающиеся высокой урожайностью, устойчивостью к полеганию, хорошими хлебопекарными и мукомольными качествами в разных климатических зонах.

В результате многолетних исследований российскому академику В.С. Пустовойту удалось добиться увеличения масличности разных сортов подсолнечника на 20%. В частности, им созданы сорта, масличность которых составляет 54–59%.

Значительные успехи достигнуты и селекционерами Беларуси. Учеными Белорусского научно-исследовательского института картофелеводства и плодоовощеводства с 1925 г. по 1995 г. выведено 69 сортов картофеля, более 70 овощных, 124 плодовых и 23 сорта ягодных культур.

Селекция животных. Основные принципы селекции животных не отличаются от принципов селекции растений. Однако, селекция животных имеет некоторые особенности: для них характерно только половое размножение; в основном очень редкая смена поколений (у большинства животных через несколько лет); количество особей в потомстве невелико. В связи с этим, в селекционной работе с животными важное значение приобретает анализ совокупности внешних признаков или экстерьера, свойственного для той или иной породы.

Одним из важнейших достижений человека на заре его становления и развития (10–12 тыс. лет назад) было создание постоянного и достаточно надежного источника продуктов питания за счет одомашнивания диких животных. Основным фактором одомашнивания служит искусственный отбор организмов, отвечающих требованиям человека. У домашних животных весьма развиты отдельные признаки, часто бесполезные или даже вредные для их существования в естественных условиях, но полезные для человека. В частности, способность некоторых пород кур давать более 300 яиц в год ли-

шена биологического смысла, поскольку такое количество яиц курица не сможет высидывать. Поэтому в естественных условиях одомашненные формы существовать не могут.

Одомашнивание привело к ослаблению действия стабилизирующего отбора, что резко повысило уровень изменчивости и расширило его спектр. При этом одомашнивание сопровождалось отбором, вначале бессознательным (отбор тех особей, которые лучше выглядели, имели более спокойный нрав, обладали другими ценными для человека качествами), затем осознанным или методическим. Широкое использование методического отбора направлено на формирование у животных определенных качеств, удовлетворяющих человека.

Процесс одомашнивания новых животных для удовлетворения потребностей человека продолжается и в настоящее время. Так, например, для получения высококачественной пушнины создана новая отрасль животноводства – пушное звероводство.

Отбор родительских форм и типы скрещивания животных проводятся с учетом цели, поставленной селекционером. Это может быть целенаправленное получение определенного экстерьера, повышение молочности, жирности молока, качества мяса и т.п. Разводимые животные оцениваются не только по внешним признакам, но и по происхождению и качеству потомства. В связи с этим, для реализации эффективного селекционного процесса необходимо хорошо знать их родословную. В племенных хозяйствах при подборе производителей всегда ведется учет родословных, в которых оцениваются экстерьерные особенности и продуктивность родительских форм в течение ряда поколений. По признакам предков, особенно по материнской линии, можно судить с известной долей вероятности о генотипе производителей.

В селекционной работе с животными в основном применяют два способа скрещивания: аутбридинг и инбридинг.

Аутбридинг или неродственное скрещивание между особями одной породы или разных пород животных, при дальнейшем строгом отборе приводит к поддержанию полезных качеств и к усилению их в ряду следующих поколений.

При инбридинге в качестве исходных форм используются братья и сестры или родители и потомство (отец – дочь, мать – сын, двоюродные братья – сестры и т.д.). Такое скрещивание в определенной степени аналогично самоопылению у растений, которое также приводит к повышению гомозиготности и, как следствие, к закреплению хозяйственно ценных признаков у потомков. При этом гомозиготизация по генам, контролирующим изучаемый признак, происходит тем быстрее, чем более близкородственное скрещивание используют при инбридинге. Однако, гомозиготизация при инбридинге, как и в случае растений, ведет к ослаблению животных, снижает их устойчивость к воздействию внешней среды, повышает заболеваемость. Во избежание этого необходимо проводить строгий отбор особей, обладающих ценными хозяйственными признаками.

В селекции инбридинг обычно является одним из этапов улучшения породы. За ним следует скрещивание разных межлинейных гибридов, в результате которого нежелательные рецессивные аллели переводятся в гетерозиготное состояние, а вредные последствия близкородственного скрещивания заметно снижаются.

У домашних животных, как и у растений, наблюдается явление гетерозиса: при межпородных или межвидовых скрещиваниях у гибридов первого поколения происходит особенно мощное развитие и повышение жизнеспособности. Классическим примером проявления гетерозиса является мул (гибрид кобылы и осла) – сильное, выносливое животное, которое может использоваться в более сложных условиях, в сравнении с родительскими формами.

Гетерозис широко применяют в промышленном птицеводстве (бройлерные цыплята) и свиноводстве, т.к. первое поколение гибридов непосредственно используют в хозяйственных целях.

Отдаленная гибридизация домашних животных менее эффективна, чем у растений. Межвидовые гибриды животных часто бесплодны. При этом восстановление плодовитости у животных представляет более сложную задачу, чем у растений, поскольку получение полиплоидов на основе умножения числа хромосом у них невозможно. Хотя, в некоторых случаях отдаленная гибридизация сопровождается нормальным слиянием гамет, обычным мейозом и дальнейшим развитием зародыша, что позволило получить некоторые породы, сочетающие ценные признаки обоих использованных в гибридизации видов. Так, в Казахстане на основе гибридизации тонкорунных овец с диким горным бараном архаром создана новая порода тонкорунных архаро-мериносов, которые, как и архары, пасутся на высокогорных пастбищах, недоступных для тонкорунных мериносов. Кроме того, таким путем были улучшены породы местного крупного рогатого скота.

Селекционерами России достигнуты значимые успехи в создании новых и улучшении существующих пород животных. Так, костромская порода крупного рогатого скота отличается высокой молочной продуктивностью (более 10 тыс. кг молока в год). Сибирский тип российской мясо-шерстной породы овец характеризуется высокой мясной и шерстной продуктивностью. Средняя масса племенных баранов составляет 110–130 кг, а средний настриг шерсти в чистом волокне – 6–8 кг. Значительны достижения и в селекции свиней, лошадей, кур и многих других животных.

В результате длительной и целенаправленной селекционно-племенной работы учеными Беларуси выведен черно-пестрый тип крупного рогатого скота. Коровы этой породы в условиях оптимального кормления и содержания обеспечивают удои по 4–5 тыс. кг молока жирностью 3,6–3,8 % в год. Генетический потенциал молочной продуктивности черно-пестрой породы составляет 6,0–7,5 тыс. кг молока за лактацию.

Селекция микроорганизмов. Предметом селекции микроорганизмов является выведение новых промышленных штаммов микроорганизмов.

Микроорганизмы значительно отличаются от других видов организмов, применяющихся в хозяйственной деятельности человека, поэтому и их селекция имеет свои отличительные особенности:

1. Малые размеры микроорганизмов обуславливают применение только массового отбора (исключая индивидуальный отбор).
2. Широкое применение находит мутагенез, т.к. микроорганизмы легко изменяются в результате воздействий различных мутагенов.
3. Важнейшим направлением совершенствования микроорганизмов является генетическая.
4. В селекции микроорганизмов, в большинстве случаев, нельзя использовать скрещивание.

Важность осуществления научных исследований в области селекции микроорганизмов обусловлена тем, что данные организмы служат основой для реализации большинства биотехнологических производств.

При этом биотехнологическое производство предъявляет к продуцентам разных БАВ жесткие требования, важные с технологической точки зрения: высокая скорость роста, использование для жизнедеятельности доступных и экономичных субстратов и устойчивость к заражению посторонней микрофлорой.

При этом научной основой биотехнологического производства является умение создавать микроорганизмы с новыми, заранее определенными генетическими свойствами и умение использовать их в промышленных масштабах.

Селекция микроорганизмов (в отличие от селекции растений и животных) отличается рядом особенностей:

- 1) у селекционера имеется неограниченное количество материала для работы: за считанные дни в чашках Петри или пробирках на питательных средах можно вырастить миллиарды клеток;
- 2) более эффективное использование мутационного процесса, поскольку геном микроорганизмов гаплоидный, что позволяет выявить любые мутации уже в первом поколении;
- 3) простота генетической организации бактерий: значительно меньшее количество генов, их генетическая регуляция более простая, взаимодействия генов просты или отсутствуют.

Выше перечисленные особенности накладывают свой отпечаток на выбор методов селекции микроорганизмов, которые во многом существенно отличаются от методов селекции растений и животных. Так, в селекции микроорганизмов обычно учитываются их естественные способности синтезировать полезные для человека БАВ (аминокислоты, витамины, ферменты и др.). В случае использования методов генетической инженерии можно заставить бактерии и другие микроорганизмы продуцировать соединения, синтез которых в естественных природных условиях им никогда не был свойственен (гормоны человека и животных и т.п.).

Этапы селекции микроорганизмов

Выбор исходного микроорганизма для селекции. Разнообразие природных форм позволяет выбрать микроорганизм, имеющий меньшее число ограничений для сверхсинтеза БАВ, хотя при этом и не продуцирует его.

В частности, оказалось очень сложным и на практике пока еще недостижимым получить промышленно значимый уровень продукции L-лизина у кишечной палочки или псевдомонад, и более простым – у представителей глутаматпродуцирующих коринебактерий: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* и др. Полученные данные позволяют это объяснить менее сложной регуляцией биосинтеза лизина у коринебактерий (в процессе биосинтеза лизина только один фермент контролируется по типу поливалентного ингибирования активности лизином и треонином, и этот контроль устраняется мутацией, блокирующей синтез гомосерина – предшественника треонина и метионина; при этом поток общих предшественников направляется только на синтез лизина), а также отсутствием деградации лизина по сравнению с регуляцией у кишечной палочки (три контролируемых фермента и более сложные формы регуляции) и выраженной способностью к деградации лизина у псевдомонад.

В ряде случаев природные штаммы с менее сложными системами ограничений сверхсинтеза выделяют в среду некоторое количество первичного метаболита (штамм *Propionibacterium shermanii* – витамин В₁₂). Такие микроорганизмы становятся объектами селекции с целью повышения уровня продукции целевого БАВ. Пригодность микроорганизма для использования в качестве объекта селекции для получения продуцента целевого БАВ можно проверить, введя ему одну или несколько определенных, легко тестируемых мутаций, которые теоретически должны обеспечить сверхсинтез данного БАВ. Это самый надежный способ выбора исходного штамма, даже если для данного вида микроорганизма отсутствуют сведения о регуляции синтеза целевого БАВ.

Для продуцентов вторичных метаболитов, а также ферментов или полисахаридов выбор исходного штамма определен способностью природного микроорганизма продуцировать определенное количество нужного БАВ. В тех случаях, когда одно и то же БАВ выделяют природные штаммы, относящиеся к разным таксономическим группам (например, грибы и бациллы), это позволяет выбрать более «технологичный» для производства или более поддающийся селекции штамм.

В этой связи, селекционер чаще всего не свободен в выборе исходного штамма для селекции и не может считать критерием такого выбора генетическую изученность микрообъекта и возможность применения в отношении него разных генетических методов. Природные свойства штаммов, определяющие такой выбор облегчают и ускоряют селекционную работу. Однако, отсутствие у многих промышленных микроорганизмов систем обмена генетической информацией не позволяет ни изучить генетический контроль био-

синтеза целевого БАВ, ни облегчить насыщение генома продуцента необходимыми для сверхсинтеза БАВ мутациями.

Подготовка исходного штамма к селекционной работе. У микроорганизма, синтезирующего целевой продукт, отобранного в качестве объекта селекции, необходимо изучить естественную изменчивость по морфологическим признакам и по количественному признаку – уровню продукции целевого БАВ. После посева исходного штамма на чашки Петри, среди не менее 100 колоний выявляют типичную для данной культуры морфологическую форму и отклонения от нее. Затем изолированные на косяки колонии (клоны) как типичной формы (не менее 100 клонов), так и доступное число ее морфологических вариантов (при условии сохранения ими своих особенностей при пересевах) оценивают после культивирования по уровню продукции нужного БАВ, применяя надежный аналитический метод. Такая оценка позволяет выявить возможную корреляцию между способностью продуцировать данное БАВ и морфологией колоний.

Несколько клонов с наиболее высоким уровнем продукции по отношению к уровню контроля, которым является исходная культура, отбирают и проверяют на продукцию в нескольких повторных опытах, а затем отбирают один клон, характеризующийся высоким и воспроизводимым уровнем. Данная процедура («чистка» исходной культуры) часто приводит к отбору клона с повышенной продукцией, а в некоторых случаях – и с отклонением от типичной морфологии.

Уровень продукции БАВ обозначают в единицах массы на объем культуральной жидкости после определенного периода культивирования микроорганизма (мкг/л, г/л и т.д.). В случае, если продукт микробного синтеза – экзогенный фермент, то его характеризуют единицами активности.

Клон, отобранный из посева исходной культуры, снова засевают, отмечают морфологическую изменчивость, если она есть, и затем оценивают по уровню продукции не менее 100 типичных для данного клона изолированных на косяки колоний. Целесообразно значения уровней продукции таких субклонов, выраженные в процентах по отношению к продукции исходного для них (родительского) клона, распределить в вариационном ряду и вычислить статистические показатели: среднее арифметическое, квадратическое отклонение и коэффициент изменчивости. Субклоны, попавшие в крайнюю правую часть данного ряда, отбирают, повторно оценивают по уровню продукции и оставляют один из них. Этот субклон засевают, как и в предыдущем случае, проверив не менее 100 колоний, строят вариационный ряд и вычисляют его показатели. Получив таким путем два вариационных ряда, сравнивают значения коэффициентов изменчивости этих рядов. В случае, если эти значения достоверно не различаются, можно подготовку исходного штамма для дальнейшей селекции закончить отбором субклона из первого вариационного ряда, а второй ряд считать контрольным для следующего этапа селекции с применением мутагенных факторов. При обнаружении у второго ряда явной тенденции к уменьшению коэффициента изменчивости целесообразно провести еще один этап клонирования, выбрав из правой части

второго ряда «лучший» клон, построить третий вариационный ряд на основе его рассева и определить значение коэффициента изменчивости. После сравнения значений коэффициентов изменчивости второго и третьего рядов дальнейшее клонирование прекращают, если эти величины для обоих рядов не различаются, и продолжают, если коэффициент изменчивости третьего ряда снижается. Целью такого ступенчатого клонирования является необходимость «стабилизировать» исходную культуру по количественному признаку, получив на основе действия стабилизирующего отбора наиболее однородную по данному признаку популяцию как надежный контроль при оценке индуцируемой мутагенами изменчивости и последующем отборе мутантов.

Следует иметь в виду, что однородность отобранной культуры снижается при многократном пассировании и длительном хранении. В этой связи, исходную культуру, которая должна служить контролем при отборе мутантов, необходимо поддерживать периодическим клонированием, проводимым в установленные для нее промежутки времени. Увеличить уровень продукции таким клонированием, как правило, не удастся. Средний уровень продукции клонов, отбираемых из правой части вариационного ряда, построенного на основе естественной изменчивости культуры, обычно равен среднему уровню продукции родительской культуры.

В том случае, когда исходная культура целевое БАВ не продуцирует, следует выбрать из ее рассева колонию, которая по таксономической характеристике полностью соответствует данному виду микроорганизма, и использовать этот клоп в дальнейшей работе с применением мутагенов.

Получение мутантов. Разные типы мутаций получают с помощью различных физических и химических мутагенов. Биоматериал (споры, вегетативные клетки, обрывки мицелия у неспорулирующих организмов), подвергающийся воздействию мутагенных факторов, должен быть дискретным и содержать минимальное количество ядер, что позволяет устранить или сократить стадию сегрегации.

Суспензия, содержащая клетки или споры, по возможности должна быть лишена комков – конгломератов, т.к. мутация в одной из клеток конгломерата при прорастании его на агаризованной среде будет утрачена или в лучшем случае проявится в виде сектора. Комки разбивают на качалке, фильтруют суспензию, но полностью избавиться от их присутствия в суспензии, обрабатываемой мутагеном, обычно не удается.

Физическими мутагенами (УФ излучение, ионизирующие излучения и др.) обрабатывают водную суспензию спор или клеток. При обработке химическими мутагенами (алкилирующие агенты: алкилметансульфонаты, алкилсульфаты, алкилнитрозомочевина, метилнитрозогуанидин и др.) следует соблюдать условия, способствующие максимальному проявлению их мутагенной активности. В данном случае большое значение имеет значение рН раствора, поэтому обработку проводят в буферных растворах при наиболее эффективных для данного мутагена значениях рН. При этом следует иметь в виду, что один и тот же мутаген для разных микроорганизмов может быть активен при разных значениях рН.

Доза воздействия физических мутагена выражается в единицах излучения, соответствующих типу радиации. Для химических мутагенов доза характеризуется концентрацией мутагена в обрабатываемой суспензии и экспозицией при определенной температуре. После истекшей экспозиции обработку химическим мутагеном прерывают отмыванием материала, помещением в буферную смесь с неоптимальным для мутагенного эффекта значением рН и (или) серией разведений в физиологическом растворе, предшествующей высева на агаризованную среду. В случае, если при поиске определенных типов мутаций суспензия должна быть высеяна на агар без разведения, то отмывание от мутагена необходимо.

При выборе дозы мутагена ориентируются на выживаемость обрабатываемого микроорганизма, которая определяется отношением числа колоний, выросших на агаре после мутагенного воздействия, к числу колоний, выросших после высева той же, но не обработанной мутагеном (контрольной) суспензии клеток, выраженным в процентах. Выживаемость зависит как от дозы мутагена, так и от чувствительности данного микроорганизма к летальному эффекту мутагена. Причем чувствительность может существенно различаться у нескольких штаммов одного вида микроорганизма. В селекционной работе, как правило, используют дозы, обеспечивающие выживаемость клеток в диапазоне от 0,1 до 50–80%.

Отбор продуктивного стабильного мутантного штамма – продуцента целевого продукта. В данном случае используют разные методы отбора полученного мутантного штамма с повышенным уровнем продукции.

Среди клеток исходного штамма микроорганизма, выживших после обработки мутагеном, производят отобрать мутанта с необходимыми свойствами. При этом возможны два альтернативных пути:

- 1) отбор случайных мутаций после оценки количественного признака, т.е. уровня продукции целевого БАВ у возможно большего числа клонов, полученных из выживших клеток;
- 2) отбор по количественному признаку среди мутантов с определенным фенотипом, например, ауксотрофных мутантов, резистентных к антиметаболиту и др., для выделения которых из числа выживших клонов в каждом случае применяют свой собственный метод отбора.

Отбор случайных (непредсказуемых) мутаций, контролирующих данный количественный признак, применяют в тех случаях, когда селекционер не располагает сведениями о пути биосинтеза целевого продукта, его регуляции и взаимосвязях с биосинтезом других метаболитов.

Метод отбора случайных мутаций осуществляется в несколько этапов, поэтому называется ступенчатым отбором с применением мутагенов. Каждый этап заключается в следующем: исходная, подготовленная к селекции культура обрабатывается мутагеном, взятым в нескольких дозах, обеспечивающих разную выживаемость. В некоторых случаях используют и несколько разных мутагенов. Из числа колоний, выросших после воздействия каждой отдельной дозой мутагена, отсеивают не менее 100 колоний для дальней-

шей оценки у них уровня продукции целевого БАВ. Отсев колоний производят тотально (без выбора), но стремясь сохранить в пределах взятой выборки процентное соотношение морфологически измененных вариантов, характерное для данной дозы мутагена. Значения уровней продукции вариантов, полученных после обработки отдельной дозой мутагена, выражают в процентах по отношению к уровню продукции исходной культуры и распределяют в вариационном ряду. Полученные вариационные ряды, число которых соответствует числу использованных доз одного или нескольких мутагенов, сравнивают с контрольным рядом, построенным на основе рассева исходной культуры. В результате сравнения выявляют «+» и «-»-варианты. «+»-варианты являются материалом для дальнейшей оценки и выбора мутанта с повышенной продуктивностью. Дозы мутагена, обеспечившие наибольшее число «+»-вариантов, целесообразно еще раз использовать для обработки исходной культуры, с тем чтобы увеличить объем материала для оценки и повысить вероятность отбора мутанта. Затем «+»-варианты отбирают, оценивают в нескольких повторных опытах на способность продуцировать целевое БАВ, выбирают лучшие и проверяют их уровень продукции после 2–3 пересевов на агаризованной среде. Все опыты по проверке лучших вариантов суммируют, результаты обрабатывают статистически и на их основании выбирают вариант, уровень продукции которого достоверно превышает уровень продукции исходного штамма. Для получения такого мутанта, даже если превышение и не очень высоко, требуется проверка нескольких сотен клонов. Нередко повышенный уровень продукции является единственным отличием отобранного мутанта от исходной культуры. Однако, в ряде случаев, особенно когда превышение по количественному признаку значительно, мутант может иметь и измененную морфологию колоний, например, сниженную споруляцию, утрату или приобретение пигмента и др., или новые культуральные признаки: иную продолжительность культивирования, устойчивость к токсичным предшественникам, чувствительность к определенным компонентам среды и т.п. Некоторые из этих сопутствующих признаков могут являться результатом нарушения физиологического и метаболического баланса, вызванного не известными исследователю мутациями, приведшими к резкому повышению уровня продукции БАВ.

Мутант, отобранный на одном этапе селекции, служит исходным материалом для следующего этапа после аналогичной процедуры подготовки. Известны случаи, когда субклонирование вновь полученного мутанта позволяло отобрать штамм с более высокой продуктивностью.

Последовательные этапы отбора, проводимого непосредственно по количественному признаку, требующего оценки многих тысяч клонов, позволяют «собрать» в геноме продуцента группу мутаций, сочетание которых обеспечивает высокий уровень продукции. Наиболее эффективными обычно являются первые этапы отбора, затем его темп падает; последнее в определенной степени преодолевается сменой мутагенного фактора, переходом на другую селекционную линию, введением некоторых мутаций.

Модификация метода отбора случайных мутаций. В работе со случайными мутациями используются приемы, предусматривающие оценку количественного признака после культивирования клонов, выделенных в результате мутагенного воздействия в условиях, специфически ограничивающих уровень продукции данного БАВ у исходной культуры. Такие условия создают за счет повышенного или недостаточного содержания определенного компонента среды, влияющего на синтез продукта, неоптимальной температурой, продолжительностью культивирования, степенью аэрации и т.д. Оценка уровня продукции в таких условиях позволяет выявить мутанты, преодолевающие созданное ограничение и сохраняющие высокую продуктивность. Так, исходный штамм *Corynebacterium glutamicum* был способен продуцировать большие количества глутаминовой кислоты (до 50 г/л) только в присутствии 2–3 мкг/л биотина. Это не позволяло использовать в питательной среде в качестве источника углерода доступное сырье – свекловичную мелассу, содержащую большое количество биотина. Оценка порядка 8000 клонов на средах с повышающимся от этапа к этапу содержанием биотина позволила получить штамм, продуцирующий глутаминовую кислоту (50 г/л) на мелассных средах. При этом на одном из этапов селекции были обнаружены две «сопутствующие» повышению продуктивности мутации: ауксотрофность по триптофану и чувствительность роста колоний к высокой температуре. Роль ауксотрофной мутации осталась неясной, однако, мутацию удалось устранить (путем реверсии) без ущерба для уровня продукции аминокислоты через несколько этапов селекции. Чувствительность к повышенной температуре сохранилась у всех продуктивных штаммов и, очевидно, явилась следствием структурных изменений в мембране. Такие изменения были необходимы клетке для выделения глутаминовой кислоты в присутствии избытка биотина, способствующего формированию «непроницаемой» для этой аминокислоты мембраны.

Таким образом, ступенчатый отбор с оценкой по количественному признаку, который осуществляется фактически «вслепую» по отношению к мутациям, вызывающим сверхсинтез, в ряде случаев выявляет эти мутации и «подсказывает» правильное направление селекции.

Отбор по количественному признаку среди мутантов с определенным фенотипом. Данный метод применяют, используя имеющиеся представления о пути, регуляции и взаимосвязях биосинтеза целевого продукта у данного микроорганизма или у других организмов, изученных в этом отношении. В настоящее время такие представления в большей степени развиты для первичных метаболитов и в меньшей – для вторичных метаболитов и ферментов.

Ауксотрофные мутации. Использование ауксотрофных мутаций позволяет блокировать образование ингибитора или корепрессора биосинтеза целевого продукта, перераспределить поток общих предшественников в разветвленных путях биосинтеза, уменьшить или остановить дальнейшее превращение данного продукта. Ауксотрофные мутанты получают с помощью мутагенов: метод обогащения, основанный на действии антибиотиков, в частности пенициллина, на растущие в минимальной среде, т.е. прототроф-

ные клетки, а также метод реплик. У полученных ауксотрофных мутантов определяют питательные потребности, отбирают мутанты с той потребностью, которую хотели получить, и у последних оценивают способность продуцировать целевое БАВ. При этом необходимо помнить, что питательная среда для ауксотрофа должна содержать необходимый для роста метаболит в ограниченном количестве, т.к. в большинстве случаев он подавляет синтез целевого продукта. Количество оцениваемых по продуктивности ауксотрофных мутантов с одинаковой питательной потребностью не должно быть сведено к 1–2 мутантам, хотя иногда и этого количества достаточно для достижения ожидаемого эффекта. В случае, если потребность в метаболите может быть обусловлена блокированием разных этапов его биосинтеза, то не на каждом этапе мутация обеспечит эффект. Кроме того, ауксотрофность не всегда вызывается блоком в пути биосинтеза. Так, для аминокислот она может быть вызвана мутацией, нарушающей включение их в белки. В этой связи, целесообразно получить и оценить продуктивность нескольких десятков мутантов с качественно одинаковой потребностью для того, чтобы выбрать наиболее продуктивный, если расчет на ауксотрофность оказался верным, и составить обоснованное представление о влиянии данной мутации на продукцию целевого БАВ.

Отбор среди ревертантов ауксотрофных мутантов, у которых ауксотрофность вызвана дефектом определенного фермента в пути биосинтеза метаболита, позволяет получить мутанты с восстановленной каталитической, но утраченной регуляторной функцией фермента, катализирующего биосинтез данного продукта, а также мутанты с неполным восстановлением каталитической функции, т.е. снижением активности фермента по отношению к активности фермента прототрофного штамма или, напротив, с усилением его активности. Перечисленные типы реверсий затрагивают один и тот же дефектный ген у ауксотрофа – они относятся к истинным реверсиям и имеют характер внутригенных супрессорных реверсий. В случае, если ауксотрофность вызвана нарушением включения аминокислоты в белки, то у супрессорных ревертантов такого ауксотрофа восстановление способности к прототрофному питанию может быть связано с мутацией другого гена, например, кодирующего регуляторный фермент в биосинтезе данной аминокислоты. Такая мутация, нарушая регуляцию биосинтеза аминокислоты, вызывает ее сверхсинтез, чем и преодолевается (супрессируется) ауксотрофность мутанта. Супрессорная мутация в другом гене может включить в особых случаях дополнительный, обходной путь биосинтеза, продукты которого не препятствуют синтезу нужного метаболита. Межгенные супрессорные реверсии в некоторых случаях затрагивают и регуляторные гены биосинтеза метаболита, например, у ауксотрофа по гистидину *Bacillus subtilis*, дефектный ген которого сцеплен с генами триптофанового оперона, реверсия к прототрофности может быть вызвана мутацией в регуляторном гене этого оперона, одновременно приводящей к сверхсинтезу триптофана.

Получить ревертанты к прототрофности несложно. После обработки мутагеном клетки ауксотрофа в большой концентрации высевают на чашки с

агаризованной минимальной средой или со средой, в которой отсутствует фактор, компенсирующий данную ауксотрофность. В течение инкубации целесообразно отмечать колонии, появляющиеся в ранние и поздние сроки. Это связано с тем, что искомые ревертанты чаще всего находятся среди позднее появляющихся и медленно растущих колоний, т.к. нужная реверсия может не полностью восстановить прототрофный фенотип. Выросшие колонии отсеивают на минимальную среду с рассевом до отдельных колоний, чтобы освободиться от ауксотрофных клеток, составлявших «фон» на чашках при появлении колоний ревертантов. Выросшие на минимальной среде колонии пересеивают на полноценную среду, а полученные клоны оценивают на способность продуцировать целевое БАВ. В случае, если исходный ауксотрофный штамм это БАВ не продуцировал, то удобно первичную оценку осуществить с помощью тест-культуры. Для продуцентов первичных метаболитов тест-культурой служат ауксотрофные мутанты с потребностью в данном метаболите. Высев с помощью репликатора проверяемых ревертантов на агаризованную среду, содержащую клетки тест-культуры, позволяет очень быстро среди большого числа клонов выявить те, вокруг которых образуются зоны роста или зоны подавления тест-культуры. Только у таких клонов затем количественно оценивают уровень продукции в соответствующих условиях культивирования. Обычно для выделения искомой мутации среди ревертантов ауксотрофного штамма необходима проверка нескольких сотен прототрофных клонов, тогда как поиск среди прямых мутаций может потребовать проверки многих тысяч клонов.

Отбор среди мутантов, резистентных к структурным аналогам аминокислот или азотистых оснований является одним из наиболее эффективных методов получения и улучшения штаммов продуцентов первичных метаболитов. Из числа различных структурных аналогов данных БАВ наиболее пригодны для селекционных целей те, которые действуют на регуляторные системы биосинтеза подобно природному метаболиту, но не могут выполнить основной функциональной роли этого метаболита в клетке. Так, аналог аминокислоты, добавленный к клеткам, находящимся в минимальной среде, имитирует избыток этой аминокислоты на уровне систем, контролирующей ее биосинтез (регуляторных ферментов и/или регуляторных генов). Однако, при этом не может заменить аминокислоту в белках: не способен включиться в белок или, включаясь, приводит к образованию дефектных белков, вызывая в обоих случаях голодание клетки по природной аминокислоте и останавливая рост. Добавление природной аминокислоты вместе с ее аналогом устраняет этот голод. В таких условиях клетка, прекратив биосинтез аминокислоты вследствие ее избытка и присутствия аналога, использует «внешнюю» аминокислоту для жизнедеятельности.

Способность аналога подавлять рост клеток и утрата этой способности в присутствии добавленного природного метаболита являются основными «приметами» пригодности аналога для селекционной работы. Эти свойства необходимо установить при его выборе среди других аналогов, т.к. много-

численные структурные аналоги природных метаболитов имеют и другие способы взаимодействия с микробной клеткой.

Для получения аналогорезистентных мутантов суспензию клеток исходной культуры после обработки мутагеном высевают в большой концентрации (газоном) на чашки Петри с агаризованной минимальной средой, содержащей аналог в заранее подобранной концентрации, ингибирующей рост исходной культуры. На таких чашках через несколько суток инкубации появляются колонии мутантов, преодолевающих действие аналога. Часть таких мутантов несут мутации, нарушающие регуляцию синтеза целевого метаболита и вызывающие его сверхсинтез, другая часть – мутации, нарушающие транспорт аналога в клетку, возможны и другие мутации.

После отсева колоний, выросших на среде с аналогом, и выделения у них отдельных клонов из каждой первичной колонии проверяют по 1–2 клонна на способность продуцировать целевое БАВ. В случае, если исходный штамм не продуцировал этот метаболит, то первичную оценку мутантов проводят с помощью ауксотрофной по данному метаболиту тест-культуры, отбирая для оценки те клоны, которые обеспечивают зоны роста или «кормление» ауксотрофных клеток. В тех случаях, когда исходная культура уже являлась продуцентом, необходима тотальная проверка всех выделенных клонов на способность продуцировать метаболит в соответствующих условиях культивирования. Из их числа отбирают те, у которых при последующих проверках средний уровень продукции достоверно превышает средний уровень продукции исходного штамма. При правильно выбранном аналоге для получения продуктивного мутанта обычно требуется проверить несколько сотен аналогорезистентных клонов. У отобранного продуктивного штамма часто определяют чувствительность к более высоким, чем ранее использованная, концентрациям аналога. В случае, если такая чувствительность имеется, проводят еще один, а иногда и несколько этапов отбора на постепенно повышающихся концентрациях аналога. Нередко используют другие аналоги того же метаболита на следующих этапах отбора.

У отобранных аналогорезистентных штаммов важно исследовать природу того регуляторного нарушения, которое привело к сверхсинтезу или повысило его уровень. Для этого у исходного штамма и мутанта определяют удельную активность регуляторного фермента (или ферментов) в пути биосинтеза данного метаболита, изучают *in vitro* действие этого метаболита и других ингибиторов на активность фермента.

Для выяснения вопроса о регуляции биосинтеза метаболита по типу репрессии конечным продуктом удельную активность регуляторных ферментов исходного штамма и мутанта определяют после выращивания в средах, содержащих метаболит (конечный продукт), и без него. Сведения о природе полученных на отдельных этапах селекции регуляторных и других изменений позволяют правильно выбрать метод селекции для последующего этапа. Следует отметить, что у одноступенчатых аналогорезистентных продуктивных мутантов может быть обнаружено одновременно несколько мутаций.

Типичным мутационным нарушением, приводящим к сверхсинтезу у отбираемых по продуктивности аналогорезистентных мутантов, признается утрата чувствительности регуляторного фермента (десенсibilизация) к ингибированию конечным продуктом, которым обычно и является целевой метаболит, а также нарушение механизма репрессии биосинтеза ферментов, что обеспечивает их неконтролируемый (конститутивный) синтез. Получены данные о том, что регуляторным мутациям у аналогорезистентных продуктивных мутантов сопутствуют и транспортные мутации, нарушающие поступление аналога и природного метаболита в клетку.

Отбор среди морфологических мутантов. Данный отбор базируется на выявлении морфологических изменений у высокопродуктивных штаммов, отобранных только по количественному признаку. При таком отборе рассчитывают не столько на корреляцию между количественным и морфологическим признаками, сколько на плейотропный эффект мутаций, вызывающих резкое повышение уровня продукции, и как следствие нарушения метаболического баланса, морфологическое изменение. Продуктивные штаммы часто оказываются малоспорулирующими или, наоборот, имеют повышенную споруляцию, они могут потерять пигмент или приобрести новый, могут изменить величину или форму колоний.

Среди колоний, выживших после мутагенного воздействия, отбирают морфологически измененные и проверяют их на продуктивность.

Выше были рассмотрены наиболее часто применяющиеся в практической селекции методы отбора штаммов с повышенной продуктивностью среди разных фенотипических классов мутантов. Основная цель использования данных методов состоит в сужении диапазона поиска «нужной» мутации для снижения его трудоемкости.

Следует отметить, что метод отбора случайных мутаций с успехом заменяется на отдельных этапах селекции продуцентов антибиотиков, ферментов, витаминов другими приемами, которые обычно применяют в селекции продуцентов аминокислот и пуриновых производных. Это вызвано обнаружением прямых взаимосвязей между биосинтезом определенных аминокислот и антибиотиков и т.д.

Селекция продуцентов витаминов

Микроорганизмы содержат большое количество витаминов, чаще всего входящих в состав ферментов.

При этом состав и количество витаминов в биомассе зависят от биологических свойств данной культуры микроорганизмов и условий культивирования. Некоторые витамины микроорганизмы синтезируют, другие напротив усваивают в готовом виде из окружающей среды.

Проведение исследований в области селекции продуцентов витаминов необходимо, прежде всего, для создания систематических и всеобъемлющих данных о сбалансировании пищевых продуктов. В настоящее время данная

информация отсутствует в базах данных национальных пищевых организаций.

В производстве витамины получают в основном путем химического синтеза.

В настоящее время микробиологическим способом можно получить практически все известные витамины.

Витамины не образуются у гетеротрофов. Способностью к биосинтезу витаминов обладают лишь автотрофные организмы.

С помощью микроорганизмов целесообразно получать сложные по строению витамины: β -каротин (провитамин А), В₂, В₁₂ и предшественники витамина D.

В мире существует 40 крупных промышленных производителей витаминов: 18 из них находятся в США, 8 – в Японии, 14 – в Западной Европе. Ведущее место в производстве витаминов занимает швейцарский концерн Hoffman L Roche, выпускающий 50–70% всех витаминов.

Селекция продуцентов рибофлавина

Витамин В₂ (рибофлавин) получил свое название от сахара рибозы, входящего в состав молекулы витамина в виде многоатомного спирта D-рибита.

Среди прокариот известными продуцентами флавинов являются микробактерии и ацетобутиловые бактерии.

Из актиномицетов – *Nocardia eritropolis*.

Среди мицелиальных грибов продуцентами рибофлавина являются *Aspergillus niger* и *Eremothecium ashbyi*.

Синтетический рибофлавин (применяемый в клинической практике) получают в виде кристаллического продукта деструктивным окислением D-глюкозы (из кукурузного крахмала) в D-арабоновую кислоту и рядом других операций превращают в конечный продукт – желто-оранжевые кристаллы высокой степени чистоты.

Витамин В₂ содержится в клетках различных микроорганизмов, являясь коферментом в составе флавопротеинов (прежде всего, соответствующих ферментов из класса оксидоредуктаз – ФМН, ФАД). В этой связи, в качестве продуцентов рибофлавина (флавопротеинов) могут быть бактерии, дрожжи и нитчатые грибы. Однако наиболее заманчивыми являются те штаммы микроорганизмов, которые образуют на жидких средах 0,5 г и более рибофлавина в 1 л культуральной среды. К таким микроорганизмам относятся: *Ashbyii gossypii*, *Eremothecium ashbyii* и *Candida guilliermondii*. Учитывая изменчивость активных продуцентов названных видов по способности синтезировать витамин В₂, необходим систематический отбор культур в процессе их эксплуатации на биотехнологическом производстве. Обычно активные продуценты первых двух видов формируют ярко-оранжевые колонии на агаризованных питательных средах.

С помощью мутагенеза и ступенчатого отбора удалось получить продуценты, производящие до 60 мг витамина на 1 л культуральной жидкости.

С помощью методов генной инженерии удалось получить штамм сенной палочки, образующий около 6 г рибофлавина в 1 л культуральной среды, включающей мелассу, белково-витаминный концентрат и его гидролизат.

Высокий выход рибофлавина у *E. ashbyii* коррелирует с азотом пуринов и другими азотистыми источниками, содержание которых должно быть достаточным. При этом в качестве источников углерода применяют глюкозу или сахарозу, практикуют использование дрожжевого и кукурузного экстрактов, соевой муки, масла (жира). Ферментационная среда обычно включает кукурузную и соевую муку, сахарозу, кукурузный экстракт, калия дигидрофосфат, кальция карбонат, натрия хлорид и ненасыщенный жир. Обычно ферментацию проводят в течение 5 суток при значении рН 5,5–7,7. После использования сахарозы (примерно через 30 часов) начинает заметно накапливаться витамин В₂, вначале – в мицелии, а затем – в культуральной жидкости.

Затем полученную биомассу можно подвергнуть высушиванию и полученный сухой продукт с остаточной влажностью 8%, содержащий 1,5–2,5% рибофлавина, 20% белка, тиамин, никотиновую кислоту, пиридоксин, цианкобаламин, микроэлементы и другие вещества, рекомендуют для кормления животных.

Для *Candida guilliermondii* важно регулировать содержание железа в питательной среде. При этом оптимальные концентрации железа варьируются, в среднем, от 0,005 до 0,05 мкг/мл. Следует учитывать, что определенные штаммы дрожжей могут образовывать за 5–7 суток до 0,5 г/л и более витамина В₂. Однако для целей промышленного производства рибофлавина предпочитают использовать более продуктивные виды и штаммы грибов – *E. ashbyii* и *Ashbyii gossypii*.

В целом промышленное получение рибофлавина осуществляется химическим, микробиологическим или комбинированным методом: при этом синтезированная микроорганизмами рибоза химически трансформируется в В₂.

Рибофлавин микробиологического производства используется исключительно как кормовая добавка в животноводстве.

Селекция продуцентов витамина В₁₂

Витамин В₁₂ – (б-5,6-диметилбензимидазол)-цианкобаламин представляет собой полимер сложного строения, являющийся гематопозитическим и ростовым фактором для многих животных и микроорганизмов.

Мировая продукция витамина В₁₂ составляет 9–11 тыс. кг в год. Из них около ½ производимой продукции используется на медицинские цели, остальное количество – в животноводстве в качестве кормовой добавки.

Следует отметить, что микробиологический синтез является единственным способом получения данного витамина. Способность к биосинтезу витамина В₁₂ широко распространена среди прокариотических микроорганизмов.

Природные продуценты витамина В₁₂ обнаружены среди пропионово-кислых бактерий рода *Propionibacterium*, которые синтезируют от 1 до 8 мг/л данного витамина.

С помощью селекционно-генетических методов получен мутант *P. shermanii* М-82, который дает до 60 мг/л целевого продукта.

Продуцент *B. rettgerii* также используется для микробиологического синтеза витамина В₁₂.

Кроме того, в качестве активных продуцентов витамина В₁₂ используются актиномицеты и родственные микроорганизмы: путем мутаций и ступенчатого отбора получен штамм *Nocardia rugosa*, накапливающий до 18 мг/л витамина В₁₂.

Активные продуценты витамина В₁₂ обнаружены и среди представителей *Micromonospora*.

Высокой природной продуктивностью в отношении витамина В₁₂ обладают представители метанотрофов: *Methanosarcina*, *Methanococcus*, среди которых выделен штамм *Methanococcus halophilus*, обладающий самым высоким среди природных штаммов уровнем продукции – 16 мг на 1 г биомассы.

В значительных количествах витамин В₁₂ синтезируют анаэробные бактерии рода *Clostridium*, что особенно эффективно для биотехнологического производства.

Кроме того, известны активные продуценты витамина В₁₂ среди *Pseudomonas*. Так, например, у *P. denitrificans* получен мутант, дающий на оптимизированной среде до 59 мг/л. Полученный штамм запатентован фирмой «Merck» для промышленного производства витамина В₁₂.

Интерес представляют термофильные бациллы *B. circulans* и *B. stearothermophilus*, синтезирующие до 2–6 мг/л витамина В₁₂.

В России наиболее широкое применение имеют *Propionibacterium freudenreichii*, которые культивируют на кукурузном экстракте и глюкозе в анаэробных условиях в течение 72 ч для роста культуры. Во второй фазе биосинтеза в ферментер вносят предшественник витамина В₁₂ – специфическое азотистое основание и проводят ферментацию еще в течение 72 ч. Затем витамин В₁₂ из биомассы бактерий и очищают химическим способом.

Цианкобаламин накапливается в клетках бактерий, поэтому операции по его выделению заключаются в следующем: сепарирование клеток, экстрагирование водой при значении рН 4,5–5,0 и температуре 85–90 °С, в присутствии стабилизатора (0,25% раствор натрия нитрита). Экстракция протекает в течение часа, после чего водный раствор охлаждают, нейтрализуют раствором едкого натра, добавляют коагулянты белка – хлорид железа трехвалентного и алюминия сульфат с последующим фильтрованием. Фильтрат упаривают и дополнительно очищают, используя методы ионного обмена и хроматографии, после чего проводят кристаллизацию витамина В₁₂ при температуре 3–4 °С из одноацетонового раствора.

Кристаллический цианкобаламин можно получать с помощью резорцина или фенола, образующих с ним аддукты, которые сравнительно легко разлагаются на составляющие компоненты.

Витамин В₁₂, полученный выше описанным способом, применяют в медицинских целях.

При реализации данного биотехнологического процесса необходимо помнить о высокой светочувствительности витамина В₁₂, поэтому все операции необходимо проводить в затемненных условиях (или в красном свете).

На ацетонобутиловой и спиртовой бардах с добавлением солей кобальта и метанола в нашей стране получают кормовой препарат КМБ-12, представляющий собой концентрат, содержащий витамин В₁₂ и другие ростовые вещества.

Для нужд животноводства витамин В₁₂ получают с использованием смешанной культуры, содержащей бактерии *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium formicum*. При этом содержание витамина В₁₂ в культуре достигает 6,5 мг/г сухой биомассы.

Концентрат витамина В₁₂ предназначен для обогащения кормов животных.

Для обогащения кисломолочных продуктов витамином В₁₂ используют пропионовокислые бактерии, как в чистом виде, так и в виде концентрата, приготовленного на основе молочной сыворотки.

Селекция продуцентов эргостерина

Эргостерин (эргоста-5,7,22-триен-3 β -ол) является исходным продуктом производства витамина D₂ и кормовых препаратов дрожжей, обогащенных данным витамином.

Эргостерин – исходный продукт производства жирорастворимого витамина D₂. Витамин D₂ (эргокальциферол) образуется при облучении ультрафиолетовым светом эргостерина, который в значительных количествах синтезируют бурые водоросли, дрожжи и плесневые грибы.

Эргостерин является основным стеринном дрожжей, поэтому данные микроорганизмы – основной источник для селекционных работ. Так, например, *Saccharomyces carlsbergensis* дает до 4,3 мг/л, *S. ellipsoideus* – 1,5 мг/л, *Rhodotorula glutinis* – 1 мг/л, *Candida utilis* – 0,5 мг/л целевого продукта. Наиболее широко в производстве эргостерина используют дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* и *S. cerevisiae*.

В промышленном биотехнологическом производстве эргостерин получают, используя дрожжи *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. carlsbergensis*, а также мицелиальные грибы. Засев производят большим количеством инокулята. Культивирование проводят при высокой температуре и сильной аэрации в культуральной среде, содержащей большой избыток источников углерода по отношению к источникам азота.

Дрожжи, а также грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium* используют для получения кристаллического витамина D₂ или концентрата.

В качестве концентрата в животноводстве обычно применяют облученные сухие дрожжи.

Максимум поглощения эргостерина отмечен при 280 нм. Именно это излучение возбуждает отдельные связи колец А и В в молекуле эргостерина и вызывает его превращение в витамин D₂. Облучение производят ультрафиолетовыми лампами с длиной волны 280–300 нм (сухие дрожжи) или в тонком слое 5%-ной суспензии дрожжей. При более коротковолновом и длинноволновом излучении повышается выход других соединений стериновой природы.

На выход витамина D₂ (а также образование других соединений стеринового ряда) оказывают влияние длительность облучения, температура, наличие примесей.

Витамин D₂ используется для лечения и профилактики рахита человека и животных.

Для получения кристаллического витамина D₂ дрожжи или мицелий грибов подвергают гидролизу раствором соляной кислоты при температуре 110 °С. Гидролизованную массу обрабатывают спиртом при температуре 75–78 °С и после охлаждения до 10–15 °С фильтруют. Фильтрат упаривают до содержания в нем 50% сухих веществ и используют в качестве концентрата витаминов группы В. Витамин D₂ получают из массы, оставшейся после стадии фильтрации. Массу промывают, сушат, размельчают и дважды обрабатывают при температуре 78 °С трехкратным объемом спирта.

Спиртовые экстракты сгущают до 70%-ного содержания сухих веществ. Таким путем получают липидный концентрат. Его омыляют раствором натрия гидроксида, при этом стерины остаются в неомыленной фракции.

Кристаллы эргостерина выпадают в осадок из раствора при температуре 0°. Очистку кристаллов проводят путем перекристаллизации, последовательным промыванием 69%-ным спиртом, смесью спирта и бензола (в соотношении 80:20) и повторной перекристаллизацией. Полученные кристаллы эргостерина сушат, растворяют в эфире, облучают, после чего эфир отгоняют, а раствор витамина концентрируют и кристаллизуют.

Для получения масляного концентрата раствор витамина D₂ после фильтрации разбавляют маслом до стандартного уровня. Источником получения эргостерина может служить мицелий грибов, остающийся как отход антибиотической промышленности и производства лимонной кислоты.

Селекция продуцентов витамина С

В последние годы появились сообщения о промышленном биотехнологическом производстве витамина С (аскорбиновой кислоты). Сообщается о конструировании генно-инженерными методами продуцента аскорбиновой кислоты: гены *Corynebacterium* перенесли в *Erw. herbicola*.

При этом в рекомбинантном штамме объединены способность эрвиний превращать глюкозу в глюконовую кислоту со способностью коринебактерий превращать последнюю в гулоновую кислоту, которую химическим способом превращают в аскорбиновую кислоту.

Селекция продуцентов каротиноидов

Каротиноиды представляют собой обширную группу природных пигментов, которые синтезируют хемо- и фототрофами: прокариотами, мицелиальными грибами и дрожжами, водорослями и высшими растениями.

В настоящее время описано около 500 различных каротиноидов.

Структурно каротиноиды представляют собой хромофор (или ядро), соединенное с изопреновыми остатками. Отличительной чертой хромофора является наличие сопряженных двойных связей, от числа которых зависит интенсивность окраски каротиноидов. Так, например, алифатические каротиноиды, содержащие не более 5 сопряженных связей, являются неокрашенными соединениями. При этом среди них наибольшее значение имеют фитоин и фитофлуин. Каротиноиды, синтезируемые *Neurospora crassa*, имеют 9 сопряженных связей и имеют ярко-желтое окрашивание. С увеличением двойных связей окраска каротиноидов усиливается до красной и фиолетовой. Высшие каротиноиды имеют в молекуле до 45–50 атомов углерода. К ним относятся сарцинаксантин, продуцируемый *Sarcina lutea*. Некоторые каротиноиды могут иметь в своем составе терминальную группировку, как алеуреаксантин гриба *Aleuria aurantia*. Другие каротиноиды имеют терминальную гидроксигруппу как α -гидроксифлеиксантин *Blakeslea trispora*.

Расположение каротиноидов в клетках микроорганизмов различно. Так, у фототрофных микроорганизмов каротиноиды сосредоточены в фотосинтезирующем аппарате; у хемотрофных – ассоциированы с клеточной мембраной; у некоторых продуцентов (*Micrococcus radiodurans*) – локализованы в клеточной стенке, а у грибов – в липидных глобулах цитоплазмы.

Каротиноиды, синтезирующиеся микроорганизмами, существуют в клетке в свободной форме, а также в виде гликозидов, в виде эфиров жирных кислот и как каротино-белковые комплексы.

Ценность данных соединений в том, что они являются источником получения витамина А.

До настоящего времени не созданы истинные продуценты каротиноидов, а каротиноиды микроорганизмов выделяют из микроорганизмов преимущественно путем экстракции.

Биологически наиболее активным является провитамин А – β -каротин.

Каротиноиды содержат клетки бактерий (микобактерии, микрококки), дрожжи (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, мукоровые грибы (*Blakeslea trispora*). Особенно богата в-каротином биомасса *Bl. trispora*, содержащая до 10–15 мг β -каротина на 1 г биомассы.

Культура дрожжей *Blakeslea trispora* образует (+) - и (-)-формы (гетероталлизм).

Посевной материал для каждой культуры готовят отдельно, а основную ферментацию реализуют в одном аппарате. Для выращивания используют методы: поверхностной и глубинной культуры.

Метод глубинного культивирования. Питательную среду готовят на доступных источниках углерода (углеводы, кислоты), часто из мелассных или

зерновых заторов; концентрация в среде – 7–8%. В качестве источника азота используют минеральные соли или органические вещества. Кроме того, в состав питательной среды добавляют 4–5% растительного масла, богатого олеиновой и линоленовой кислотами, также 0,1% β -иона.

Выращивание посевного материала осуществляют в течение около 48 ч, основная ферментация длится – 5–6 сут. при температуре 28 °С, значении рН – 6,2–6,7. Во время ферментации среда аэрируется.

Интенсивные биосинтез каротиноидов начинается после использования азота питательной среды. Образование каротиноидов стимулируют – жирные кислоты, β -ион, экстракты цитрусовых, помидоров, моркови, дрожжей, а также керосин.

Во время ферментации необходимо добавить в питательную среду ПАВ (0,1%) для предотвращения образования жировых конгломератов. После ферментации мицелий фильтруют и сушат в вакууме при температуре 50–55 °С.

Каротин извлекают из сухого размельченного мицелия экстракцией эфиром или растительными маслами. Для получения кристаллического каротина биомассу в течение 1–1,5 ч обрабатывают в экстракторе четырехкратным объемом бензола. В присутствии углекислоты бензол отгоняют. Полученный концентрат каротина омыляют 10% раствором гидроксида калия в течение 20 мин. при температуре 50 °С. Коагулят, содержащий каротин, фильтруют, осадок промывают спиртом. Из полученной массы каротин экстрагируют эфиром при комнатной температуре, затем фильтруют, из фильтрата в вакуум-аппарате эфир отгоняют и получают насыщенный раствор каротина. Кристаллизацию ведут вначале при комнатной температуре, затем при температуре 5 °С. Выпавшие кристаллы фильтруют, промывают спиртом и сушат в вакуумных сушилках. Кристаллы каротина должны быть однородными, фиолетово-красного цвета с металлическим отливом. Содержание каротина в препарате не должно быть ниже 90%, температура плавления кристаллов не ниже 160 °С.

Каротиноиды выполняют в клетке роль антиоксидантов и защищают ее от явления перекисного окисления.

Кроме того, каротиноиды являются фотоловушками, собирающими световую энергию.

Промышленное биотехнологическое получение каротиноидов. Традиционные методы получения каротиноидов сводятся к гомогенизации биомассы и экстракции каротиноидов с помощью полярных растворителей (ацетон, метанол).

Каротиноиды получают путем разделения методом тонкослойной хроматографии на силикагеле, а также путем химического синтеза.

Традиционными продуцентами микробиологического синтеза каротиноидов являются бактерии, мицелиальные грибы и дрожжи. Из фототрофных бактерий следует отметить *Chloroflexus* и некоторые виды *Rhodospseudomonas*. Данная группа бактерий интересна тем, что у них в зависимости от интенсивности освещения можно регулировать выход каротиноидов.

дов. В Японии биомассу данных бактерий используют для окрашивания желтка яиц в качестве добавки в рацион.

Кроме того, каротиноиды получают в значительных количествах из некоторых водорослей, например, *Chlorella sp.*

Среди хемотрофов продуцентами каротиноидов являются дрожжи *Rhodotorula gracilis*, *R. rubra*, *R. diobovatum*, а также актиномицеты – *Act. chrestomycetes*, *Act. chysomallus*, микобактерии – *Mycobacterium pheii*, *M. carotenum*, мицелиальные грибы семейств *Mucoraceae* и *Dacrymycetaceae*.

Продуцентами β -каротина традиционно являются мукоровые грибы *Blakeslea trispora* и *Choanephora conjuncta*. При совместном культивировании смешанные культуры обеспечивают выход целевого продукта до 3–4 г/л среды.

Для получения β -каротина на основе *Blakeslea trispora* используют сложные по составу питательные среды: кукурузно-соевый крахмал, дополненный маслами, поверхностно-активными веществами и стимуляторами каротинообразования. При этом процесс биосинтеза каротиноидов протекает в несколько этапов. Сначала отдельно выращивают разнополюые штаммы гриба, затем их смешивают, вносят стимуляторы каротинообразования (пирролидон, сукцинамид и т.д.). Причем различные типы каротиноидов: (α -, β -, γ -), ликопин образуются при стимулирующем воздействии различных веществ. В этой связи, использование *B. trispora* в качестве продуцента обусловлено не только активностью биосинтеза каротиноидов, но и возможностью регуляции вида целевого продукта.

Регуляция биосинтеза каротиноидов зависит:

1) От источника углерода. В случае, если вводить в питательную среду целлобиозу, то биосинтез каротиноидов данным штаммом увеличивается в 7 раз;

2) От внесения в питательную среду отходов целлюлозного производства, что повышает одновременно и выход β -глюкозидазы.

С помощью мутантных штаммов дрожжей *Rhodospiridium diobovatum* получают каротиносодержащий препарат, включаемый как белково-каротиноидная добавка в кормовой рацион скота.

В настоящее время разработан способ получения каротиносодержащего препарата с помощью мутантного штамма *Mycobacterium rubrum*. Полученный препарат является комплексным, он содержит в своем составе α -, β - и γ -каротины, ликопин и ксантофиллы.

Для биотехнологического производства ксантофиллов в качестве продуцента используют гриб *Dacrymyces deliquescens*. Выход каротиноидов на глюкозосодержащей среде с глицерином и кукурузным экстрактом составляет 40 мг/л.