

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
образования «Горский государственный аграрный университет»  
(ФГБОУ ВО Горский ГАУ)

Кафедра землеустройства и экологии

## ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

учебное пособие для обучающихся по специальности

35.02.05 Агрономия

УДК 53 : 632

**Составитель:** Сабанова А.А.

**Рецензент:** Лазаров Т.К. – д-р с.-х. наук, доцент, декан агрономического факультета ФГБОУ ВО Горский ГАУ

Основы биотехнологии: учебное пособие / Составитель: А.А. Сабанова –  
Владикавказ: ФГБОУ ВО Горский ГАУ, 2023 – 93 с.

Приведен теоретический материал для изучения дисциплины основы биотехнологии. Обозначенные в пособии методические установки позволяют систематизировать знания по основам биотехнологии.

Для обучающихся по специальности 35.02.05 Агрономия

© *Издательство ФГБОУ ВО Горский ГАУ, 2023*

© *Сабанова А.А.*

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Предмет, объекты и значение биотехнологии.....	4
Содержание и задачи предмета.....	4
Объекты и методы биотехнологии.....	4
Этапы развития биотехнологии.....	5
2. Основы молекулярной биологии.....	11
Молекулярная биология – основа генетической инженерии.....	11
Ферменты генетической инженерии.....	12
Конструирование рекомбинантных ДНК.....	13
3. Генетическая инженерия растений.....	18
Методы трансформации растительных клеток и улучшение качества и продуктивности растений.....	18
Получение трансгенных растений, устойчивых к стрессовым условиям, фитопатогенам, насекомым и гербицидам.....	21
4. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве.....	28
Культура клеток и тканей.....	28
Клональное микроразмножение растений.....	34
5. Генетические основы биотехнологии в симбиотической азотфиксации..	42
Гены азотфиксации и их регуляция.....	42
Бобово-ризобийный симбиоз и повышение эффективности биологической фиксации азота.....	45
6. Биотехнология кормовых препаратов.....	45
Получение кормовых белков.....	45
Производство незаменимых аминокислот и кормовых витаминов.....	59
Производство кормовых витаминных препаратов.....	64
7. Биотехнологические альтернативы в сельском хозяйстве.....	74
Защита растений от фитопатогенов и возможности генной инженерии..	74
Биопестициды.....	75
Биологические удобрения.....	86
Литература.....	93

# 1. ПРЕДМЕТ, ОБЪЕКТЫ И ЗНАЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ.

## *Содержание и задачи предмета.*

Биотехнология – это наука об использовании биологических процессов в технике и промышленном производстве. Название ее происходит от греческих слов bios – жизнь, technos – умение, мастерство, logos – слово, учение, наука. К числу биологических процессов относят те из них, в которых применяют биологические объекты различной природы микробной, растительной или животной, например, производство ряда продуктов медицинского, пищевого, сельскохозяйственного и другого назначения – антибиотики, ферменты, пищевой и кормовой белки, гормоны, алкалоиды, удобрения, биогаз и другие.

В соответствии с определением Европейской Федерации Биотехнологов биотехнология базируется на интегральном использовании биохимии, микробиологии и инженерных наук в целях промышленной реализации способностей (возможностей) микроорганизмов, культур клеток тканей и их частей. Уже в самом определении предмета отражено его местоположение как пограничного, благодаря чему результаты фундаментальных исследований в области биологических, химических и технических наук приобретают выражено прикладное значение.

Биотехнология – это дитя XX века, появившееся после рождения еще двух технологий – электроники и ядерной технологии. Функцию биотехнологии можно охарактеризовать как целенаправленное превращение материи и энергии с помощью организмов или продуктов их жизнедеятельности.

Биотехнология непосредственно связана с общей биологией, микробиологией, ботаникой, зоологией, анатомией и физиологией, биологической, органической, физической и коллоидной химией, иммунологией, биоинженерной электроникой, технологией лекарств, генетикой и другими науками.

В широком смысле биотехнологию можно определить как использование механизмов функционирования живой клетки для получения высокоэффективных форм живых организмов с заранее заданными свойствами, полезными для хозяйственной деятельности человека.

В более узком смысле это получение организмов с заданными свойствами на основе достижений молекулярной биологии и генной инженерии.

## *Объекты и методы биотехнологии.*

Биотехнология как наука является важнейшим разделом современной биологии, которая, как и физика, стала в конце XX в. одним из ведущих приоритетов в мировой науке и экономике.

Всплеск исследований по биотехнологии в мировой науке произошел в 80-х годах, когда новые методологические и методические подходы обеспечили переход к эффективному их использованию в науке и практике и возникла реальная возможность извлечь из этого максимальный экономический эффект. По прогнозам,

уже в начале 21 века биотехнологические товары будут составлять четверть всей мировой продукции.

В нашей стране значительное расширение научно-исследовательских работ и внедрение их результатов в производство также было достигнуто в 80-е годы. В этот период в стране была разработана и активно осуществлялась первая общенациональная программа по биотехнологии, были созданы межведомственные биотехнологические центры, подготовлены квалифицированные кадры специалистов-биотехнологов, организованы биотехнологические лаборатории и кафедры в научно-исследовательских учреждениях и вузах.

Однако в дальнейшем внимание к проблемам биотехнологии в стране ослабло, а их финансирование сокращено. В результате развитие биотехнологических исследований и их практическое использование в России замедлилось, что привело к отставанию от мирового уровня, особенно в области генетической инженерии.

Что касается более современных биотехнологических процессов, то они основаны на методах рекомбинантных ДНК, а также на использовании иммобилизованных ферментов, клеток или клеточных органелл. Современная биотехнология — это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

В рамках изучаемого курса можно выделить 3 основных части:

1. *Промышленная биотехнология*, где рассматриваются общие принципы осуществления биотехнологических процессов, происходит знакомство с основными объектами и сферами применения биотехнологии, рядом крупномасштабных промышленных биотехнологических производств, использующих микроорганизмы.

2. *Клеточная инженерия*. Основная цель этого раздела – *знакомство* с методами ведения культур клеток и практическим использованием этих объектов. В рамках этого раздела выделяют *культивирование растительных клеток* и *методы культивирования животных клеток*, так как подходы к культивированию этих объектов различаются в силу их принципиальных биологических различий. Клеточная биотехнология обеспечила ускоренное получение новых важных форм и линий растений и животных, используемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество; размножение ценных генотипов, получение ценных биологических препаратов пищевого, кормового и медицинского назначения

3. *Генная инженерия*. Высшим достижением современной биотехнологии является генетическая трансформация, перенос чужеродных генов и других материальных носителей наследственности в клетки растений, животных и микроорганизмов, получение трансгенных организмов с новыми или усиленными свойствами и признаками. По своим целям и возможностям в перспективе это направление является стратегическим. Оно позволяет решать коренные задачи селекции биологических объектов на устойчивость, высокую продуктивность и качество продукции при оздоровлении экологической обстановки во всех видах производств. Однако для достижения этих целей предстоит преодолеть огромные трудности в повышении эффективности генетической трансформации и прежде

всего в идентификации генов, создании их банков клонирования, расшифровке механизмов полигенной детерминации признаков и свойств биологических объектов, обеспечении высокой экспрессии генов и создании надежных векторных систем. Уже сегодня во многих лабораториях мира, в том числе и в России, с помощью методов генетической инженерии созданы принципиально новые трансгенные растения, животные и микроорганизмы, получившие коммерческое признание.

Современная биотехнология тесно стыкуется с рядом научных дисциплин, осуществляя их практическое применение или же являясь их основным инструментом (рис. 1).

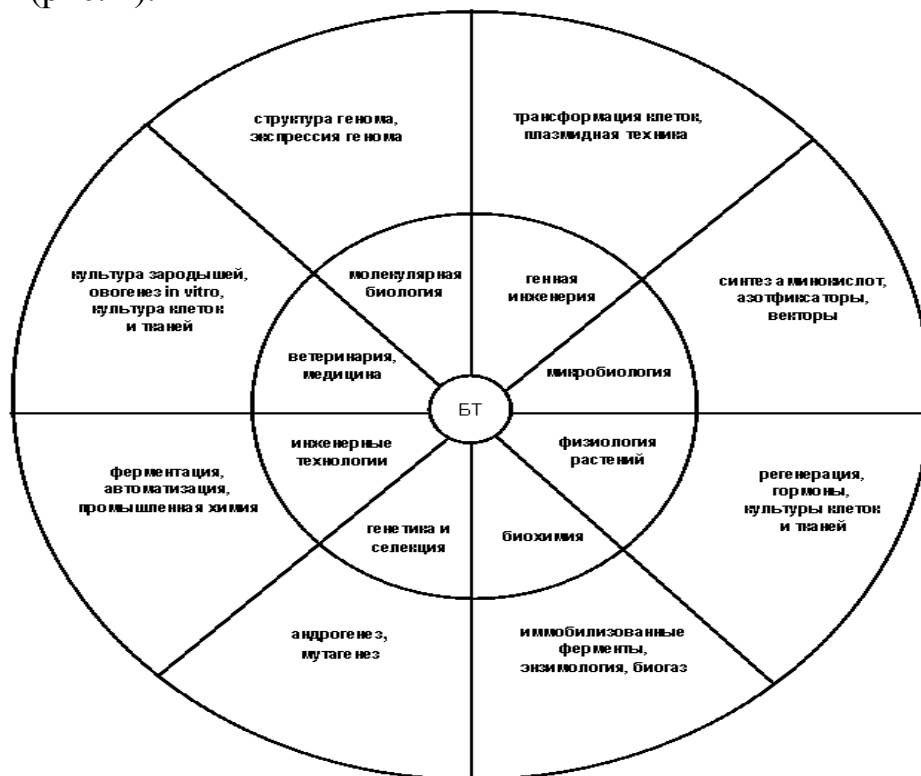


Рис. 1. Связь биотехнологии с другими науками  
(по В.И.Кефели, 1989)

В молекулярной биологии использование биотехнологических методов позволяет определить структуру генома, понять механизм экспрессии генов, смоделировать клеточные мембраны с целью изучения их функций и т.д. Конструирование нужных генов методами генной и клеточной инженерии позволяет управлять наследственностью и жизнедеятельностью животных, растений и микроорганизмов и создавать организмы с новыми полезными для человека свойствами, ранее не наблюдавшимися в природе.

Микробиологическая промышленность в настоящее время использует тысячи штаммов различных микроорганизмов. В большинстве случаев они улучшены путем индуцированного мутагенеза и последующей селекции. Это позволяет вести широкомасштабный синтез различных веществ.

Некоторые белки и вторичные метаболиты могут быть получены только путем культивирования клеток эукариот. Растительные клетки могут служить источником ряда соединений - атропин, никотин, алкалоиды, сапонины и др. Клетки животных и

человека также продуцируют ряд биологически активным соединений. Например, клетки гипофиза - липотропин, стимулятор расщепления жиров, и соматотропин - гормон, регулирующий рост.

Созданы перевиваемые культуры клеток животных, продуцирующие моноклональные антитела, широко применяемые для диагностики заболеваний. В биохимии, микробиологии, цитологии несомненный интерес вызывают методы иммобилизации как ферментов, так и целых клеток микроорганизмов, растений и животных. В ветеринарии широко используются такие биотехнологические методы, как культура клеток и зародышей, овогенез *in vitro*, искусственное оплодотворение. Все это свидетельствует о том, что биотехнология станет источником не только новых продуктов питания и медицинских препаратов, но и получения энергии и новых химических веществ, а также организмов с заданными свойствами.

### *Этапы развития биотехнологии.*

Наука формировалась и эволюционировала по мере формирования и развития человеческого общества. Это непосредственно относится и к биотехнологии. Ее возникновение, становление и развитие условно можно подразделить на 4 периода: эмпирический, этиологический, биотехнический и генотехнический.

Эмпирический – самый длительный, охватывающий примерно 8000 лет, из которых более 6000 лет – до нашей эры и около 2000 лет – нашей эры. Древние народы того времени интуитивно использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива и некоторых других продуктов, которые теперь мы относим к разряду биотехнологических. Кризис охотничьего промысла (хозяйства) стал побудительным мотивом революции в изготовлении продуктов питания. Эта революция началась около 8000 лет тому назад и привела к изобретению техники земледелия – началу производительного ведения хозяйства (неолит и бронзовый века). Стали формироваться так называемые приречные цивилизации Месопотамии, Египта, Индии и Китая.

Шумеры – первые жители Месопотамии (на территории современного Ирака) создали цветущую в те времена цивилизацию. Они выпекали хлеб из кислого теста, владели искусством готовить пиво (около 10 сортов). В этом следовали им ассирийцы и вавилоняне, жившие также в Месопотамии, египтяне и древние индусы.

В течение нескольких тысячелетий известен уксус, издревле изготавливавшийся в домашних условиях, хотя о микробах, индукторах этого процесса мир узнал только в 1868, благодаря работам Луи Пастера, и это несмотря на существование с XIV века так называемого «Орлеанского» способа приготовления уксуса; первая дистилляция вина осуществлена в XI веке; водку из хлебных злаков получили в XVI в.; шампанское известно с XVIII века, но получение почти абсолютного этанола впервые удалось в XIV веке испанцу Раймунду Луллию (около 1235-1315) благодаря перегонке вина с негашеной известью.

В те древние времена продукты питания растительного и животного происхождения использовались не только в пищу, но и для лечебных целей.

Например, в ассирийской столице Ниневии (8-7 века до н.э.) была царская библиотека, насчитывавшая более 30000 клинописных табличек, из которых в 33 имелись сведения о лекарственных средствах и их рецептуре, и в самом городе размещался сад лекарственных растений. К тому же эмпирическому периоду относятся: получение кисломолочных продуктов, квашенной капусты, медовых алкогольных напитков, силосование кормов, мочка лубоволокнистых растений.

Длительное накопление фактов происходило и в области микологии (от греч. *muses* – гриб). Сведения о грибах можно найти в писанных источниках древности, а Луций Лициний Лукулл (106-58 г.г. до н.э.), славившийся богатством, роскошью и пирами («Лукуллов пир») предпочитал всем съедобным грибам кесарев гриб – *Amanita cesabeae*. В IV – I веках до н.э. были собраны интересные материалы о грибах, нашедших отражение в работах Аристотеля, Diosкорида, Плиния Младшего и Теофраста.

Таким образом, народы истари пользовались на практике микробиологическими процессами, ничего не зная о микробах. Эмпиризм также был характерен и в практике использования полезных растений и животных.

Второй, этиологический (от греч. *aitia* – причина) период в развитии биотехнологии охватывает вторую половину XIX века и первую (половину) треть XX века (1856-1933 г.г.). Он связан с выдающимися исследованиями великого французского ученого Л. Пастера (1822 - 1895) – основоположника научной микробиологии и ряда микробиологических дисциплин (промышленной, медицинской, химической, санитарной). Это, по существу, бриллиантовый век микробиологии. Немеркнущая слава Л. Пастера не затмила имен его выдающихся учеников и сотрудников. Э. Дюкло, Э. Ру, Ш.Э. Шамберлана, Ж.А. Вильемена, И.И. Мечникова. В этот период творили Р. Кох, Д. Листер, Ш. Китазато, Г.Т. Риккетс, Д.И. Ивановский, А. Лаверан и др. Параллельно с Пастером трудился в Германии, а позднее во Франции, выдающий миколог А. Де Бари (1831 – 1888) – основоположник физиологической микологии, у которого учились Ф.И. Бальфур, И.В. Баранецкий, М. Бейеринк, О. Брефельд, М.С. Воронин, А. Кох, А.С. Фаминицин, С.Н. Виноградский и др.

В биотехнологии важными объектами являются питательные среды для культивирования микробов и других биообъектов: Луи Пастер приготовил первую жидкую питательную среду в 1859 г.; метод выращивания грибов на желатине предложил О. Брефельд в 1864 г.; Ш. Ролен сообщил о жидких средах для выращивания нитчатых грибов в 1870 г.; Р. Коху в 1876 г. удалось вырастить бациллы сибирской язвы в капле водянистой влаги, извлеченной из глаза погибшей коровы. В 80 годы XIX века Р. Кох предложил метод культивирования бактерий на стерильных ломтиках картофеля, а затем на агаризованных средах.

В настоящее время, предлагая самые сложные и необычные в каком-либо отношении среды для выращивания биообъектов, мы опираемся на основополагающие результаты этих выдающихся ученых.

Этиологический период знаменателен тем, что удалось доказать индивидуальность микробов и получить их в чистых культурах. Более того, каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях



воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.). Например, маслянокислые бактерии и вызываемое ими маслянокислое брожение, уксуснокислые бактерии и окисление этанола до уксусной кислоты и т.д. В этот период начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также некоторых продуктов обмена – ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот и т.д.; во Франции приступили к созданию биоустановок для микробиологической очистки сточных вод.

Знание причин биологических процессов еще не исключало нестерильные операции, хотя и стремились к использованию чистых культур микробов. Для всестороннего изучения морфофизиологических свойств и продуктов обмена микробов, все ранее предложенные способы их выращивания оказались малопригодными. Более того, накопление однородной по возрасту большой массы клеток оставалось исключительно трудоемким процессом. Вот почему требовался принципиально иной подход для решения многих задач в области биотехнологии.

Третий период – биотехнический. В 1933 г. А. Клюйвер и Л.Х. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке и интерпретации получаемых результатов при глубинном культивировании грибов. С этого времени и начинается третий период в развитии биотехнологии – биотехнический. Началось внедрение в биотехнологию крупномасштабного герметизированного оборудования, обеспечивающего проведение процессов в стерильных условиях.

Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков (во время второй мировой войны 1939 – 1945 г.г., когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами). Всё прогрессивное в области биологических и технических наук, достигнутое к тому времени, нашло свое отражение в биотехнологии. К этому времени были накоплены различные научные факты, которые стали побудительным мотивом для разработки способов крупномасштабного культивирования клеток различного происхождения. Это необходимо было для получения различных клеточных продуктов и самих клеток для нужд человека, и прежде всего, в качестве лечебных и профилактических средств: пенициллина, стрептомицина, тетрациклина, декстрана, ряда аминокислот и многих других веществ.

К 1950 г. Ж. Моно (Франция) разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микробов. В пятидесятые годы вопросам практической реализации непрерывного культивирования микроорганизмов посвятили свои исследования М. Стефенсон, И. Малек, Н.Д. Иерусалимский и др.

Примерно за 40 лет третьего периода были решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования, в том числе главного из них – биореакторов (ферментеров). Это оборудование используют и в настоящее время.

Четвертый период в биотехнологии – генотехнический (генно-инженерный) (от

греч. genesis – происхождение, возникновение, рождение) начался с 1972 года. В этом году П. Берг со своими сотрудниками в США создали первую рекомбинантную молекулу ДНК.

Естественно, что без фундаментальной работы Ф. Крика и Дж. Уотсона (1953) по установлению структуры ДНК было невозможно достигнуть современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и регуляции ДНК, выделение и изучение специфических ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнологических процессов на основе генно-инженерных работ. В этом суть генотехнического периода.

Уже в 1982 г. поступил в продажу человеческий инсулин, выработанный кишечными палочками, несущими в себе искусственно встроенную генетическую информацию об этом гормоне.

На таком же уровне или с близким к тому заделом находятся следующие генно-инженерные препараты – интерфероны, фактор некротизации опухоли (TNF), интерлейкин – 2, соматотропный гормон человека и аналог его соматомедин Ц и другие.

Зная строение аппарата наследственности у разных организмов, удается манипулировать не только нуклеиновыми кислотами, но и целыми хромосомами (хромосомная инженерия) и клетками (клеточная инженерия).

Для генотехнического периода характерны разработка интенсивных процессов на основе направленных фундаментальных исследований:

а) с продуцентами антибиотиков, ферментов, аминокислот, витаминов; получение суперпродуцентов, несущих в себе бессмысленную генетическую информацию (например, гены интерферона в клетках *Ps. aeruginosa*);

б) создание необычных организмов ранее не существовавших в природе (неклубеньковых растений, несущих гены азотобактерий, ответственные за способность фиксировать N<sub>2</sub> из воздуха);

в) разработка и внедрение экологически чистых и, по возможности, безотходных технологий;

г) разработка и внедрение в практику специальной аппаратуры блочного (сменного) типа для различных биотехнологических производств;

д) автоматизация и компьютеризация биотехнологических процессов;

е) создание экономически оптимальных производственных процессов при максимальном использовании сырья и минимальном потреблении энергии.

В любом биотехнологическом процессе самым важным звеном является биообъект, организм, «капризы» которого по любому поводу могут пагубно сказаться на результатах этого процесса.

В течение последних 10-15 лет прошлого столетия происходило бурное развитие биотехнологии, определились сферы приоритетного внедрения конкретных результатов биотехнологических разработок и как следствие появились такие названия как медицинская биотехнология, иммунобиотехнология, инженерная энзимология, биогеотехнология, экологическая биотехнология, сельскохозяйственная биотехнология, промышленная (пищевая) биотехнология,

экономическая биотехнология и др.

## 2. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ.

### *Молекулярная биология – основа генетической инженерии.*

По А.А. Баеву, генетическая инженерия — это конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе – создание искусственных генетических программ. Рекомбинантные ДНК придают организму новые генетические и другие свойства.

Возникновение генетической инженерии связано прежде всего с развитием молекулярной биологии. Исследования, проведенные в этой области за последние десятилетия, позволили перейти от описания структуры и функции клеток на уровне органелл к установлению молекулярных механизмов протекающих в них процессов.

В конце 60-х годов многие исследователи считали, что молекулярные механизмы фундаментальных генетических процессов – репликации, транскрипции, трансляции, а также система их регуляции в основном изучены. Стройное, логичное здание молекулярной биологии, казалось, было в основном построено. Схема, показывающая строго однонаправленный поток генетической информации, ДНК-РНК- белок, была названа основной догмой молекулярной биологии и свидетельствовала о незыблемости возведенного здания. Правда, основные положения этой схемы были в основном показаны для кишечной палочки *Escherichia coli*, которая является прокариотическим организмом, не имеющим истинного ядра. Однако логичность и простота схемы давала возможность считать ее универсальной для всего живого, в том числе и для эукариотических организмов, имеющих ядро, к которым относятся животные, растения и человек.

Однако, несмотря на несомненные успехи молекулярной биологии прокариот, геном сложных организмов был практически недоступен для анализа. Изучение общих биохимических свойств клетки не давало надежды на установление деталей генетической организации: слишком велики были геномы эукариотических организмов и слишком сложно было проводить с ними какие-либо эксперименты. Для этого необходимо было, как минимум, научиться «разрезать» ДНК не в случайных, а в строго определенных местах, с точностью до одного нуклеотида. Возникла и другая проблема — невозможность определения последовательности нуклеотидов в ДНК. Не было выделено ни одного гена, не была расшифрована структура гена. Одна из причин такой ситуации заключается в том, что даже простейшие организмы содержат очень длинные молекулы ДНК (геном кишечной палочки составляет  $4,2 \cdot 10^6$  н. п.), а геном высших эукариот, в том числе растений и млекопитающих, содержит 10<sup>9</sup> – 10<sup>10</sup> н. п. В геноме содержится несколько десятков тысяч генов.

Сейчас генетическая инженерия позволяет вводить в ядерный аппарат реципиента не только отдельные новые гены и регуляторные последовательности, исходно не присущие данному организму, но и получать новые формы организмов путем введения целых хромосом, отдельных органелл или слияния двух клеток.

## ***Ферменты генетической инженерии.***

Ферменты генетической инженерии — это ферменты, позволяющие проводить различные манипуляции с молекулами ДНК: разрезать в определенных местах, соединять различные по происхождению фрагменты, синтезировать новые, не существующие в природе последовательности, и т. д. Рассмотрим основные ферменты генетической инженерии.

*ДНК-полимеразы.* Одним из наиболее часто используемых в генетической инженерии ферментов является ДНК-полимераза I, выделенная из *E. coli* или фага T4. ДНК-полимераза I обладает способностью удлинять цепь ДНК в направлении 5'—>3' путем присоединения комплементарного нуклеотида. Это свойство ДНК-полимераз используется в генной инженерии для построения второй комплементарной цепи: при добавлении фермента к одноцепочечной ДНК-матрице в присутствии праймера произойдет ее удвоение. Это свойство используется, например, при создании кДНК-библиотек. ДНК-полимераза применяется также для заполнения «бреши» в цепи ДНК, например, при застраивании фрагментов с выступающими 5'-концами. Экзонуклеазная активность ДНК-полимераз используется для введения радиоактивной метки во фрагмент ДНК.

Использование специфических термостабильных ДНК-полимераз — *Tth*- и *Taq*-полимераз — выделенных из бактерий, живущих в гейзерах, позволило проводить амплификацию — множественную наработку любого фрагмента ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР, в основу которого положена *Taq*-полимераза, не только упростил некоторые старые методики генной инженерии, но и позволил проводить молекулярное маркирование как отдельных генов, так и целых геномов.

Из некоторых вирусов была выделена специфическая ДНК-полимераза — РНК-зависимая ДНК-полимераза, названная обратной транскриптазой, или ревертазой. Ревертазы могут синтезировать комплементарную цепь ДНК на РНК-Матрице. С помощью ревертаз можно получать кДНК-ДНК-копии мРНК. кДНК позволяют изучать строение генов и идентифицировать полноценные копии этих генов в геноме.

*ДНК-лигаза* осуществляет одну функцию — соединение фрагментов ДНК путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами. Этот процесс называется лигированием. Наиболее часто для лигирования в генной инженерии используют ДНК-лигазу фага T4. С помощью лигазы T4 соединяют любые фрагменты ДНК любыми концами: «липкими» или «тупыми» (см. ниже). Это один из наиболее часто используемых ферментов.

*Нуклеазы* — это большая группа ферментов, катализирующих реакцию гидролиза молекул нуклеиновых кислот. В результате действия нуклеаз молекула ДНК или РНК распадается на фрагменты или отдельные нуклеотиды. Исходная функция нуклеаз в клетке — деградация ненужных в данный момент жизнедеятельности молекул (например, деградация мРНК после трансляции) и защита от чужеродных молекул нуклеиновых кислот (расщепление фаговой ДНК бактериальными нуклеазами при заражении бактерии фагом).

Нуклеазы по типу их действия можно поделить на группы. Нуклеазы могут действовать только на молекулы ДНК (ДНКазы) или РНК (РНКазы), либо на молекулы и ДНК, и РНК одновременно (нуклеаза золотистой фасоли). Нуклеазы избирательно могут действовать на одноцепочечную (нуклеаза S1), или двуцепочечную (экзо- нуклеаза III) молекулы ДНК, или на гибридную ДНК — РНК-молекулу (рибонуклеаза H).

Кроме того, нуклеазы можно разделить на два типа: на экзонуклеазы и эндонуклеазы. Экзонуклеазы обычно гидролизуют молекулы с 5'- или 3'-свободных концов, а эндонуклеазы могут расщеплять внутри последовательности фрагмента или кольцевой молекулы ДНК.

*Рестриктазы.* Отдельную группу, особенно с утилитарной точки зрения ее применения в генной инженерии, представляют специфические эндонуклеазы — рестриктазы.

В основе метода, позволившего непосредственно приступить к манипуляциям с генами, лежит открытие ферментов, названных рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами). Еще в 1953 г. было обнаружено, что ДНК определенного штамма *E. coli*, введенная в клетки другого штамма (например, ДНК штамма В в клетки штамма С), не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на фрагменты ДНК специфическими ферментами — рестриктазами. К настоящему времени из разных микроорганизмов выделено более тысячи различных рестриктаз. В генетической инженерии наиболее широко используются около двухсот.

Рестриктазы представляют собой особый класс эндонуклеаз, которые гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, называются сайтами рестрикции. Каждая из рестриктаз узнает свой сайт рестрикции и разрезает ДНК либо внутри последовательности сайта рестрикции, либо в непосредственной близости от него. Таким образом, при действии конкретной рестриктазы одна и та же последовательность ДНК будет всегда образовывать одинаковый набор фрагментов. Обозначение рестриктаз складывается из начальных букв латинского названия вида бактерий, из которого был выделен фермент, и дополнительного обозначения, так как из бактерий одного вида может быть выделено несколько различных рестриктаз: *Escherichia coli* — EcoR I, EcoR V; *Haemophilus influenzae* — Hinf I; *Sreptomycetes albus* — Sal I; *Thermus aquaticus* — Taq I.

Рестриктазы делятся на несколько типов по характеру расщепления нуклеотидной последовательности. Рестриктазы I типа узнают сайт рестрикции, но расщепляют последовательность ДНК на произвольном расстоянии (от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов) от сайта узнавания. Такие рестриктазы невозможно использовать для решения генно-инженерных задач. Рестриктазы III типа похожи на рестриктазы I типа, они гидролизуют ДНК на расстоянии 20—35 н. п. от сайтов узнавания и также довольно редко используются для практических целей.

Ферменты, используемые для получения рекомбинантных молекул, — рестриктазы II типа. Основной характеристикой таких рестриктаз является то, что у них сайты узнавания и места рестрикции совпадают. Обычно рестриктаза II типа

узнает определенную последовательность на ДНК и гидролизует ее внутри последовательности сайта рестрикции.

Фрагменты ДНК, имеющие одинаковые «липкие» концы, могут соединяться друг с другом с помощью ДНК-лигазы, при этом сайт рестрикции восстанавливается. Фрагменты, имеющие «тупые» концы, могут быть соединены вне зависимости от того, какой рестриктазой они были образованы. Фрагменты с «липкими» концами более удобны для создания рекомбинантных ДНК, так как ДНК-лигаза обеспечивает беспрепятственное соединение фрагментов.

Ферментативная активность рестриктаз измеряется в единицах активности. Это такое количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза за один час 1 мкг ДНК фага X при оптимальных условиях. Оптимальные условия рестрикции для каждой рестриктазы являются индивидуальными и зависят от pH, ионной силы, присутствия определенных ионов, температуры проведения реакции. Рестриктазы являются основными ферментами, используемыми в генетической инженерии.

### ***Конструирование рекомбинантных ДНК.***

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Определенные фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с «тупыми», так и с «липкими» концами. Соединение фрагментов ДНК в единую молекулу производится несколькими методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК.

*Соединение фрагментов по одноименным «липким» концам.* Некоторые рестриктазы, например *EcoR I*, вносят в цепи ДНК симметричные, расположенные с образованием «ступеньки» разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания. Эти комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований и поэтому их называют комплементарными, или «липкими» концами.

Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образующиеся при действии рестриктазы *EcoR*, не будут спариваться, например, с АГСТ-концами, образуемыми *Hind III*. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут «слипаться» за счет образования водородных связей между однонитевыми участками комплементарных нуклеотидов.

Однако после такого спаривания целостность двойной спирали не восстановится, поскольку останется два разрыва в фосфодиэфирном остове. Для их восстановления, т. е. сшивания, или лигирования нитей используют фермент ДНК-лигазу. Таким образом, лигаза завершает образование рекомбинантной молекулы ДНК. Впервые такие эксперименты были выполнены в 1972 г. (П. Берг, США) и было показано, что использование рестриктазы, дающей «липкие» концы, в сочетании с ДНК-лигазой может послужить основой для создания общего метода

получения рекомбинантных молекул ДНК. В этой лаборатории впервые были соединены рекомбинантное ДНК вируса SV40 и бактериофага X.

*Соединение фрагментов по «тупым» концам.* «Тупые» концы фрагментов ДНК, полученные после действия рестриктаз, производящих прямой разрез внутри сайта рестрикции, также могут быть соединены за счет действия ДНК-лигазы. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность на порядок ниже, чем при сшивке по «липким» концам. Однако преимущество соединения фрагментов с «тупыми» концами по сравнению с «липкими» в том, что не имеет значения, какие рестриктазы образовывали эти «тупые» концы: фрагменты, образованные в результате действия разноименных рестриктаз, легко соединимы.

*Соединение фрагментов с разноименными концами.* «Липкие» концы можно ферментативным путем присоединить к молекулам ДНК с «тупыми» концами. Для этого «затупляют» «липкие» концы. Это достигается либо отщеплением нуклеотидов «липких» концов с помощью фермента — нуклеазы S1, которая разрушает только одноцепочечную ДНК, либо «липкие» концы «застраивают», т. е. с помощью ДНК-полимеразы I на однонитевых «липких» концах синтезируют вторую нить.

Таким образом, из фрагмента ДНК с «липкими» концами получается фрагмент с «тупыми», и он соединяется с другим фрагментом ДНК с «тупыми» концами ДНК-лигазой.

После того как фрагменты ДНК соединены в пробирке, их надо ввести в живые клетки. Для этого используют специальные молекулы — векторы.

*Векторные молекулы. Трансформация.* Ключевой операцией в генетической инженерии является введение в клетку и стабильное поддержание генетической информации, содержащейся в рекомбинантных молекулах ДНК. Это достигается при помощи так называемых векторных молекул, или векторов. Дело в том, что при обычном введении ДНК, например в бактериальную клетку, она, как правило, подвергается атаке ферментов, которые гидролизуют ее на составные компоненты — нуклеотиды. В некоторых случаях ДНК «выживает» в клетке, однако в процессе деления клеток она не наследуется и теряется. Для того чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться в ее геном (интегрироваться в хромосому) и реплицироваться за ее счет, либо быть способной к автономной репликации.

Векторами называются молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и обеспечивающие ее репликацию, экспрессию и/или трансформацию (перенос в другие организмы). Таким образом, вектор позволяет осуществить введение в клетку дополнительной генетической информации. В качестве векторов используют, как правило, плазмиды, бактериофаги, мобильные элементы, вирусы животных. В настоящее время создано большое число векторов, и по профилю использования их можно разделить на несколько типов.

Векторы для клонирования используют для увеличения количества (амплификации) фрагмента ДНК, встроенного в такой вектор, посредством репликации. В этом качестве наиболее часто используются бактериальные плазмиды и фаги. Для клонирования больших фрагментов генома используют векторы —

искусственные бактериальные и дрожжевые хромосомы (ВАС и УАС).

Экспрессионные векторы используют для анализа конкретных последовательностей генов и их белковых продуктов, а также наработки конкретного белка. Существует огромное количество экспрессионных систем, особенно для прокариотических организмов. Есть также векторы для экспрессии генов в клетках дрожжей, растений и млекопитающих. Экспрессионные векторы для эукариотических организмов всегда содержат так называемую экспрессионную кассету, состоящую из промотора, способного работать в данном организме, и сайта полиаденилирования.

3. Векторы для трансформации используют для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента. Обычно такие векторы содержат специфические последовательности, способствующие интеграции в геном.

Современные векторные системы часто бывают полифункциональными, совмещая несколько функций в одном векторе. Первые естественные векторные плазмиды были выделены из бактерий; в последующем большинство векторов было сконструировано при помощи методов генетической инженерии в соответствии с задачами экспериментаторов (экспрессионные векторы, векторы для клонирования, векторы для трансформации).

Часто в составе векторной молекулы бывает маркерный ген, который после проникновения вектора в клетку придает ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора. Иными словами, вектор должен иметь селективный генетический признак. Часто в качестве селективных используют широко распространенные в природе гены устойчивости к антибиотикам. Белковые продукты этих генов, обычно ферменты, модифицирующие антибиотики и инактивирующие их действие. Например, ген *nptII*, кодирует фермент неомицинфосфотрансферазу, инактивирующий антибиотик канамицин. В присутствии гена бактериальная клетка приобретает устойчивость к канамицину и на среде с этим антибиотиком образует клон или колонию клеток. Обычные же клетки, не содержащие ген *nptII*, на данной среде погибают. Таким образом, присутствие маркерного гена *nptII* в векторной конструкции позволяет обнаружить те клетки, в которых присутствует вектор, и отобрать их.

В целом к векторной молекуле предъявляются следующие основные требования: вектор должен содержать уникальные сайты рестрикции для нескольких рестриктаз, что делает возможным встроить в него фрагмент чужеродной ДНК;

вектор должен обладать определенной емкостью и не абортировать встроенный фрагмент;

вектор должен реплицироваться в определенных клетках за счет имеющейся последовательности точки начала репликации (ориджина);

вектор должен содержать последовательность маркерного гена, облегчающего селекцию клеток, несущих векторную конструкцию.

Использование бактериальных плазмид в качестве векторов для клонирования. Клетки бактерий содержат хромосомную ДНК. Однако помимо хромосом бактерии содержат большое число небольших (1—25 т. н. п.) кольцевых молекул ДНК. Такие кольцевые молекулы называют плазмидами. Некоторые плазмиды имеют в своем

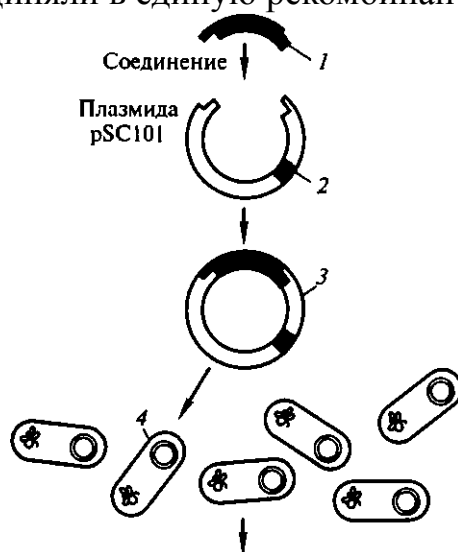


составе гены устойчивости к антибиотикам, представленные большим числом копий. Высокая копияность плазмид обеспечивает клетке синтез большого количества ферментов, биохимически нейтрализующих антибиотики, что и обеспечивает устойчивость бактериальной клетки к последним.

Как было сказано выше, в присутствии ионов кальция плазмиды легко поглощаются бактериями, которые их не содержали. Однако бактериальная клетка обычно может содержать в своем составе плазмиды только одного типа.

Число копий плазмиды в клетке может существенно варьировать. Это зависит от генетических особенностей как клетки, так и плазмиды. Некоторые плазмиды могут размножаться до тех пор, пока их число не достигнет 10—200 копий на клетку. Другие типы плазмид реплицируются с той же скоростью, что и бактериальная хромосома. Такие плазмиды содержатся в клетке в количестве одной или нескольких копий. Естественно, для целей клонирования используют векторы на основе плазмид первого типа.

Впервые плазида в качестве вектора была использована в 1973 г. в лаборатории П. Берга. Эксперименты проводились с небольшой (9 т. н. п.) плазмидой *E. coli* рSC101, несущей ген устойчивости к антибиотику тетрациклину. Она содержала только один сайт рестрикции для *EcoR* I. Под действием рестриктазы кольцевая плазида превращалась в линейную молекулу с «липкими» концами. Такую ДНК плазмиды рSC101 смешивали с *EcoR* I-фрагментом чужеродной для кишечной палочки ДНК (ДНК золотистого стафилококка). С помощью ДНК-лигазы фрагмент чужеродной ДНК и плазмиды рSC101 соединяли в единую рекомбинантную молекулу.



Отбор клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК, по способности расти в присутствии антибиотика

Затем такую рекомбинантную плазмиду добавляли к компетентным клеткам *E. coli*, плазида входила внутрь бактериальной клетки. Клетки с рекомбинантной плазмидой отбирались на селективной среде с тетрациклином (рис.). Этот исторический опыт положил начало генетической инженерии. Стало ясно, что можно будет проводить дальнейшие эксперименты с встраиванием различных фрагментов чужеродных про- и эукариотических ДНК и получать клетки с новыми свойствами.

### 3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ.

#### *Методы трансформации растительных клеток и улучшение качества и продуктивности растений.*

Метод кокультивации с агробактерией является одним из самых распространенных методов получения трансгенных двудольных растений. Он основан на трансформации растительных эксплантов агробактериями, несущими векторную конструкцию, содержащую чужеродный ген, встроенный в область T-ДНК. Его популярность связана с относительной простотой проведения трансформации и довольно высоким выходом полученных трансгенных растений (10—60% в зависимости от вида растения).

В качестве исходного материала необходимо иметь штамм агробактерии с векторной конструкцией (бинарной, коинтегративной или другой, приемлемой для этого типа трансформации). Вектор должен содержать последовательность гена, который необходимо ввести в геном растения. Происхождение гена (прокариотический или эукариотический) не столь важно для трансформации, однако он должен находиться под контролем промотора, способного экспрессироваться в растительной клетке. Кроме функционального гена вектор должен содержать селективный маркер трансформации. В качестве такого маркера обычно используются гены устойчивости к антибиотикам канамицину (ген *npt*), гигромицину (ген *hpt*) и/или гербицидам хлорсульфону (ген *ALS*), фосфинотрицину (BASTA) (ген *bar*). Кроме того, должны быть подобраны сорта растения-реципиента. В качестве эксплантов для трансформации обычно берут стерильные листовые диски. Однако можно брать и молодые корешки (арабидопсис), гипокотили (томаты), семядоли (томаты, баклажаны), междоузлия (картофель).

Экспланты инокулируют жидкой средой, содержащей агробактерию с векторной конструкцией. Время инокуляции подбирается для каждого вида растений индивидуально. При этом происходит заражение клеток раневой поверхности экспланта, и после 24–48 ч кокультивирования в некоторых клетках происходит встраивание в растительный геном фрагмента T-ДНК с чужеродным (выбранным) геном. Далее экспланты переносят на среду с антибиотиком (карбенициллин или цефотаксим), что приводит к избирательной гибели клеток агробактерий. Кроме того, в среду добавляют соответствующие фитогормоны (для прямой регенерации или каллусообразования) и антибиотик/гербицид для проведения селективного отбора трансформированных клеток. Такие трансгенные растения, экспрессирующие ген устойчивости к антибиотику или к гербициду, будут расти на среде с добавлением селективного агента, в то время как нетрансгенные растения погибнут. Через 2–5 недель на трансформированном экспланте развиваются побеги, которые в дальнейшем отсаживают или переносят в почву для проведения дополнительного молекулярного анализа.

Сходным образом трансформируют протопласты, однако такого рода трансформация значительно менее эффективна из-за низкой способности к

регенерации самих протопластов.

Методом кокультивации с агробактериями к настоящему времени получены трансгенные растения практически всех сельскохозяйственных двудольных растений. Этот метод применим также и для некоторых однодольных (пшеница, кукуруза, рис).

*Методы прямого переноса генов в растение.* Для прямого переноса генов в растительные клетки очень часто используется трансформация растительных протопластов. При обработке клеточной стенки растения ферментами (целлюлазой, пектиназой) клеточная оболочка разрушается и остается один протопласт. Разработаны методы прямой трансформации протопластов с помощью ДНК. Наибольшей эффективности трансформации ( $10^{-2}$ ) удалось достигнуть методом электропорации и добавления полиэтиленгликоля. Хотя частота трансформации значительно ниже, чем, например, при агробактериальной трансформации, метод прямого переноса обладает рядом преимуществ. Вектор может не содержать специальных биологических сигналов и функций трансформации (пограничных областей T-ДНК и *vir*-области). Для трансформации может быть использован практически любой ДНК-вектор, несущий чужеродный ген. При этом гибридный ген интегрирует в ядерную ДНК растения и экспрессируется (при наличии соответствующих регуляторных областей), особенно в случае прямой инъекции в ядро протопласта, используя механизмы клеточной рекомбинации. Однако основным недостатком такого метода является крайне низкая частота трансформации.

В настоящее время более 140 видов растений были протрансформированы путем прямого переноса ДНК вектора в протопластные клетки различными методами.

*Микроинъекции ДНК.* В ряде экспериментов было показано, что метод микроинъекций может успешно применяться для трансформации растительных клеток аналогично микроинъекциям в животные клетки. Это стало возможным после преодоления ряда технических трудностей, в частности, разработки метода получения протопластов для инъекций путем прикрепления их к стеклам полилизинном. Перенос ДНК в цитоплазму или ядро растительной клетки осуществляют микроинъекциями раствора, содержащего ДНК целевого гена. Микроинъекции очень трудоемкий процесс, требующий специального оборудования. Для этого используют специальные микроманипуляторы и микроиглы.

Трансформация растительных протопластов происходит с эффективностью не более 10–15 %, независимо от типа вектора, и подходит как для двудольных, так и для однодольных растений.

*Электропорация.* Этот метод основан на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. Для растительных протопластов процедура электропорации оказалась очень эффективной. Метод состоит в следующем: на растительные протопласты, находящиеся в растворе большой концентрации, содержащем ДНК-векторы, действуют высоковольтным импульсом (напряжение 200–350 В, длительность импульса 54 мс). В результате молекулы ДНК поглощаются клетками через поры в клеточной мембране. После разведения раствора протопласты высеваются на соответствующую среду для

регенерации. Эффективность переноса определяется через 24–48 ч после электрошока.

*Упаковка в липосомы.* Это один из методов, используемых для защиты экзогенного генетического материала, который вводится в протопласты растений, от действия нуклеаз, которые разрушают нуклеиновые кислоты.

Липосомы – это сферические образования, оболочки которых состоят из фосфолипидов. Их можно получить в результате резкого встряхивания или обработки ультразвуком водных эмульсий фосфолипидов. С помощью липосом в протопласты растений были введены РНК вируса табачной мозаики, ДНК Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, а также целые метафазные хромосомы. К преимуществам систем переноса с помощью липосом можно отнести их низкую токсичность по отношению к клеткам и возможность использования на множестве растений, клетки которых способны утилизировать липосомы. В настоящее время этот способ трансформации применяется все реже из-за его технической сложности и низкой трансформирующей активности (0,5–1 %).

Основные проблемы при описанных выше методах прямой трансформации обычно связаны с низкой регенерационной способностью протопластов и, следовательно, крайне низким выходом растений-трансформантов.

*Вакуумная инфильтрация.* Метод трансформации растений с помощью вакуумной инфильтрации был разработан относительно недавно и используется как для трансформации побегов, так и семян. Метод основан на том, что верхушечные части молодого растения или предварительно обработанные семена (с частично разрушенным перикарпом) помещаются в раствор агробактериальных клеток, несущих вектор с целевым геном. Емкость с раствором и эксплантами помещается в камеру, где создается отрицательное давление. В результате этого агробактерия проникает в межклетники растительного экспланта, что в дальнейшем приводит к трансформации. Метод вакуумной инфильтрации довольно дешев и достаточно эффективен. Так как, в отличие от методов трансформации с помощью липосом, микроинъекций или электропорации, при вакуумной трансформации в качестве эксплантов используются не протопласты, он не требует дополнительных реактивов.

*Метод биобаллистической трансформации.* Метод биобаллистики, являясь одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации однодольных, может также с успехом применяться на двудольных. В качестве исходного материала для трансформации берется суспензионная культура, каллусная ткань или культивируемые незрелые зародыши однодольных.

Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, платины или золота диаметром 0,6–1,2 мкм напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые платиновые или золотые частички, несущие ДНК, на целлофановой подложке помещаются внутрь биобаллистической пушки. Каллус или суспензия клеток вносятся в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биобаллистическую пушку на расстоянии 10–15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые или золотые частички с огромной скоростью выбрасываются из пушки и, разрывая

клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток. Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых или золотых частиц, в то время как в зоне 0,6–1 см от центра будут находиться трансформированные клетки.

Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.

С помощью биобаллистической пушки были трансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень, и получены стабильные трансгенные растения.

Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биобаллистическая трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбриогенную пыльцу и получения трансгенных дигаметоидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. Этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гаптомидных растений получены стабильные трансформанты.

### ***Получение трансгенных растений, устойчивых к стрессовым условиям, фитопатогенам, насекомым и гербицидам.***

Одной из основных задач улучшения растений является повышение качества синтезируемых продуктов: белков, жиров, полисахаридов и других веществ, определяющих их питательную и техническую ценность.

У злаков наибольший интерес представляют запасные белки эндосперма. Запасные белки в основном кодируются несколькими, сходными по своей структуре и по нуклеотидному составу, генами, объединяемыми в мультигенные семейства. Обычно экспрессия этих генов строго тканеспецифична и происходит на определенной стадии развития семени. В большинстве случаев запасные белки растений имеют несбалансированный для питания человека и животных аминокислотный состав. Так, запасные белки бобовых – легумины – характеризуются низким уровнем аминокислоты метионина, а запасные белки злаков – проламины – бедны лизином, триптофаном и треонином. Дефицит этих аминокислот снижает питательную и кормовую ценность семян.

Улучшение аминокислотного состава белка методами традиционной селекции довольно затруднительно в связи с тем, что гены, определяющие эти важные сельскохозяйственные признаки, часто бывают сцеплены и наследуются вместе с генами, вызывающими нежелательные признаки. Так, использование в селекции кукурузы и ячменя мутантов типа opak-2, хайпроли, имеющих относительно высокое содержание лизина в зерне, не привело к значительному улучшению качества, так как у мутантных форм повышенное содержание лизина коррелировало с уменьшением синтеза основных запасных белков зеина и гордеина и, в конечном итоге, с уменьшением продуктивности растений и урожайности посевов.

В связи с этим наиболее перспективным является использование генно-инженерных методов при создании новых сортов, что позволяет ввести в геном только полезный признак, без сцепления с отрицательными свойствами. Так,

например, введение дополнительных кодонов лизина в гены проламинов может привести к синтезу белков, обогащенных лизином, и улучшению кормовой и питательной ценности белка.

Технология генно-инженерного улучшения качества растений и получаемой из них продукции включает ряд этапов:

- 1) клонирование генов запасных белков;
- 2) изучение механизмов тканеспецифичной и временной экспрессии белков и определение последовательностей ДНК, определяющих и регулирующих такую специфическую экспрессию;
- 3) целенаправленное изменение последовательности генов запасных белков с целью улучшения аминокислотного состава;
- 4) создание векторов, содержащих измененный ген;
- 5) введение модифицированных генов в растения;
- 6) тестирование экспрессии генов и качества продукции.

Получение трансгенных растений с улучшенными качествами зерна невозможно без подготовительного этапа, включающего детальное изучение как последовательности самого гена, так и его элементов, участвующих в регуляции синтеза белка.

Учеными уже охарактеризованы десятки генов запасных белков злаков, бобовых и ряда других растений, изучены структура и регуляция экспрессии генов. Исследователи уже клонировали 10 генов гордеинов ячменя, гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -глиадинов и глютелина пшеницы, зеинов кукурузы, легуминов бобовых, пататина картофеля и др. Для некоторых генов определена их нуклеотидная последовательность.

Общий план изолирования генов запасных белков включает следующие этапы: 1) получение и частичная очистка соответствующей мРНК; 2) синтез и клонирование кДНК; 3) выделение из геномных библиотек последовательности гена запасного белка.

Синтез запасных белков имеет жесткую регуляцию: гены экспрессируются только в единственной ткани (проламины злаков только в эндосперме зерна) и в течение короткого периода развития зерна. Исследование генов запасных белков показало общность их строения, что представляется логичным, так как они выполняют одинаковую функцию. Так, общим для подавляющего большинства генов запасных белков является отсутствие интронов. Кроме этого, у них на расстоянии 300 н. п. от точки начала транскрипции расположена специфическая последовательность в 25 н. п., названная эндосперм-боксом. Была определена функция эндосперм-бокса и показано, что именно от присутствия этой 25-нуклеотидной последовательности зависит тканеспецифичная экспрессия генов запасных белков в эндосперме зерна. Более того, продукт любого гена, перед которым находится последовательность эндосперм-бокса, синтезируется только в семенах или зернах, и представлялось логичным включение ее в состав векторов, содержащих модифицированную последовательность генов проламиновых белков с целью их последующего депонирования в семенах или зернах.

Следующий этап в получении трансгенных растений с улучшенным аминокислотным составом белка можно представить на примере

модифицированного азеина. Белок азеина кукурузы характеризуется низким содержанием лизина, что значительно снижает его питательную ценность. В последовательность гена азеина при помощи олигонуклеотид-направленного мутагенеза вводили дополнительные кодоны лизина. Полученный модифицированный ген азеина экспрессировал белок, содержащий лизин. Впервые такая работа была проведена по введению новых кодонов в последовательность азеина. Теперь такое введение новых триплетов для изменения (улучшения) аминокислотного состава белков является обычным.

Модифицированный ген азеина был клонирован в область Т-ДНК вектора для трансформации. В состав конструкции также входила последовательность эндосперм-бокса, что приводило к тканеспецифичной экспрессии азеина в семенах. Были получены растения кукурузы, трансформированные геном модифицированного азеина, обогащенного лизином. Модифицированный белок активно синтезировался в семенах трансгенных растений кукурузы. В результате получены линии кукурузы с улучшенным качеством зерна. В дальнейшем такие трансгенные линии могут использоваться для выведения новых гибридов и сортов методами классической селекции.

Аналогично были получены трансгенные растения пшеницы. Введение в геном растения модифицированного гена высокомолекулярной субъединицы белка глютеина с измененной последовательностью приводит к активному синтезу модифицированного белка и влияет на состав и уровень соответствующих запасных белков, что приводит к улучшению хлебопекарного качества пшеничной муки.

Одним из новых подходов к улучшению состава белков является конструирование химерных генов на основе известной последовательности генов запасных белков одно- и двудольных. В качестве исходных были использованы гены гордеина В1 ячменя и легумина В4 бобов. Конструкцией, содержащей такой химерный ген, были трансформированы растения табака и получены трансгенные линии растений.

Таким образом, реальной становится возможность манипулирования белковым составом эндосперма зерновых методами генетической инженерии.

Помимо получения растений с измененными запасными белками было показано, что трансгенные растения могут быть использованы в качестве производителей «съедобных» вакцин. Так, получены растения табака и картофеля, синтезирующие иммуноглобулин А –G, энтеротоксин, В-токсин холеры, белок поверхностного антигена гепатита В. Белок, полученный из трансгенных растений, обладал такими же антигенными и физиологическими свойствами, как и белок, полученный из животных клеток. В настоящее время проводятся испытания по вакцинированию человека против гепатита В при помощи трансгенных растений. Из этого следует, что использование трансгенных растений может привести в будущем к получению дешевых и биологически высокоактивных вакцин.

Помимо получения трансгенных растений с модифицированными запасными белками зерновых и бобовых проводятся работы по улучшению *состава жирных кислот* ряда масличных культур, и в первую очередь рапса. Семена рапса характеризуются высоким содержанием масла, однако из-за большого количества в

нем специфической длинноцепочечной эруковой кислоты, а также глюкозинолатов вкусовые и питательные качества рапсового масла резко снижаются. С помощью генетической инженерии и последующей селекции были получены сорта рапса, содержащие гены, контролирующие длину молекулы жирных кислот, что привело к снижению доли эруковой кислоты и улучшению качества рапсового масла. Аналогичные работы ведутся по получению модифицированных жирных кислот с повышенным содержанием ненасыщенных связей, что позволит получать растения, синтезирующие новые ценные жирные кислоты. Кроме того, в последнее время было показано, что изменение состава жирных кислот может приводить к повышению устойчивости растений кряду насекомых, а также к действию пониженных температур.

К 2001 г. уже прошли полевые испытания сорта трансгенных растений сои, рапса и кукурузы с модифицированным составом жирных кислот.

Экстремальное влияние окружающей среды, такое как засуха, избыточное увлажнение, воздействие высоких или низких температур, засоление и кислотность почв приводит к значительным потерям сельскохозяйственной продукции. Поэтому использование сортов растений, толерантных к стрессовым воздействиям, имеет большое экономическое значение.

Многие из адаптивных реакций растений на стресс обуславливаются синхронным взаимодействием множества генов. Поэтому более доступными для генно-инженерных исследований оказываются биохимические процессы, непосредственно индуцировавшиеся фактором стресса. Так, известно, что в растениях, подвергающихся длительному водному стрессу, накапливается ряд органических низкомолекулярных соединений, таких, как пролин, глицинбетаин, и ряд других, которые служат осморегуляторами или осмопротекторами.

Было показано сходство стрессового ответа у бактерий и высших растений: в обоих случаях в клетках происходит синтез молекул осмопротекторов, механизмом действия которых является установление осмотического баланса между цитоплазмой и окружающей средой и, кроме того, частичная стабилизация белков при стрессовых условиях. Сходные биохимические пути синтеза молекул осмопротекторов позволили использовать гены бактериального происхождения для получения трансгенных растений, устойчивых к стрессам.

Из генома *E. coli* были выделены два гена *proBosm* и *proA*, кодирующие ферменты пути биосинтеза пролина, аккумулярование которого в клетке происходит в ответ на осмотический стресс. Экспрессия этих бактериальных генов в геноме растений приводила к повышенному синтезу пролина. Полученные трансгенные растения табака осуществляли повышенный синтез и накопление пролина по сравнению с контрольными растениями. Трансгенные побеги укоренялись и могли расти при концентрации соли в среде 20 г/л (350 мМ).

Был выделен ген бетаинальдегиддегидрогеназы (*BADH*), который катализирует синтез глицинбетаина. Трансгенные растения табака, экспрессирующие этот ген, обладали повышенной солеустойчивостью.

Было показано, что устойчивость к высоким температурам связана с геном *Fad7<sub>y</sub>*, белок которого влияет на метаболизм жирных кислот. Инактивация такого гена в



трансгенных растениях риса привела к тому, что растения могли расти при повышенных температурах и выдерживать до двух часов при + 47 °С.

Полевые испытания сорта трансгенных газонных трав на засухоустойчивость и устойчивость к засолению проходят с тем, чтобы в дальнейшем их можно было использовать в больших городах с характерным абиотическим фоном.

*Получение трансгенных растений, устойчивых к насекомым.*

Используя генно-инженерные методы, возможно конструирование растений с повышенной резистентностью к атаке насекомыми. Так, было показано, что бактерии *Bacillus thuringiensis* экспрессируют инсектицидный белок-протоксин, который, попадая в кишечник насекомых, расщепляется под действием протеазы активного токсина, приводящего к гибели вредителей.

Препараты на основе этого токсина использовались для обработки растений в поле. Полученные препараты были нестойкими и довольно быстро разлагались, что не позволяло развить у вредителей устойчивость к инсектициду, в то время как продукция таких белков в растительных клетках могла обеспечивать устойчивую резистентность растений к насекомым.

Из генома *B. thuringiensis* был выделен ген токсина *Б12* и поставлен под контроль промотора 35S CaMV. Б1-Ген был интегрирован в геном растений табака методом агробактериальной трансформации. Экспрессия бактериального *Б12*-гена в растительных клетках была подтверждена как на уровне транскрипции, по присутствию соответствующей мРНК, так и на уровне трансляции, по синтезу белка-токсина. Полученные трансгенные растения табака были устойчивы к вредителям. Эффективность защиты сельскохозяйственных культур от вредителей была показана и на трансгенных растениях томата, трансформированных генами эндотоксина, при этом бактериальный белок, синтезированный в тканях растений, обеспечивал защитный эффект, сравнимый с использованием инсектицидных препаратов.

Помимо табака и томата бактериальный *Б12*-ген был введен в геном многих сельскохозяйственных растений, в том числе в картофель, кукурузу, хлопчатник, рис, сою, брокколи и др. Для ряда культур получены сорта трансгенных растений, экспрессирующих в своем геноме *Б12*-ген. Так, в 1994–1995 гг. были получены и прошли полевые испытания сорта томата, картофеля и хлопчатника (фирма «Monsanto»), кукурузы как кормовой, так и пищевой сахарной (фирма «Novartis»), а в 1998 г. был получен сорт картофеля с тройной устойчивостью, который помимо *А12*-гена, содержал ген устойчивости к вирусу скручивания листьев и ген устойчивости к гербициду глифосату. В 2000 г. в странах с разрешенным использованием генетически модифицированных продуктов сортами трансгенных растений, устойчивых к насекомым, были засеяны около 380 тыс. га, из них: 230 тыс. га – трансгенным хлопчатником, 144 тыс. га – трансгенной кукурузой, 5 тыс. га – трансгенным картофелем.

Использование трансгенных растений привело к резкому сокращению применения инсектицидов и повышению урожайности.

*Получение трансгенных растений, устойчивых к грибной, бактериальной и вирусной инфекции.*

При действии фитопатогенов в растениях включается каскад механизмов защитных реакций. При этом активные ответные реакции в растениях могут проходить по двум основным направлениям: во-первых, в ответ на инфекцию начинается синтез соединений, являющихся токсичными и ограничивающих жизнедеятельность патогенов, что в конечном итоге приводит к их гибели. Во-вторых, в качестве защитного ответа могут создаваться структурные барьеры, которые предотвращают повреждение растений и распространение патогенов, что достигается лигнификацией клеточных стенок растений либо укреплением клеточных стенок за счет гликопротеидов, богатых гидроксипролином, и других соединений, так называемых экстенсинов, что приводит к защите тканей от повреждения фитопатогенами.

В ответ на инфицирование вирусами, бактериями и грибами индуцируются специфические PR-белки (pathogenesis related proteins), в том числе и наиболее изученные хитиназы и Р-1,3-глюканазы. Эти ферменты ингибируют рост грибов, а также некоторых видов бактерий.

Экспериментально был доказан фунгицидный эффект белков хитиназ и глюканаз, а также их кодирование одиночными генами. Поэтому гены хитиназы и глюканазы были использованы в генно-инженерных работах по получению трансгенных растений, устойчивых к фитопатогенам. Были получены трансгенные растения табака, хлопка, кукурузы, рапса, томата, риса, картофеля, люцерны, турнепса и других, экспрессирующих ген хитиназы под контролем промотора 35S CaMV. У этих растений наблюдалась устойчивость к грибной инфекции. В настоящее время получены трансгенные сорта табака, рапса, томатов, картофеля с повышенной устойчивостью к *Rhizoctonia*, растения табака — к *Cercospora nicotiana*.

Другую группу соединений, также обладающих фунгицидным эффектом, представляют низкомолекулярные белки (40—50 кДа), к которым относятся цистеиновые белки растений, ингибиторы галактуроназ, растительные дефензины, группа MF-белков. Все эти белки обычно неспецифически повышают устойчивость растений к различным грибным и бактериальным инфекциям. Трансгенные растения, экспрессирующие этот белок, обладают устойчивостью как к грибной, так и к вирусной инфекции.

В процессе изучения взаимоотношений вирус – растение было вовлечено большое число различных методов. Только их комбинирование могло принести результаты по получению растений, устойчивых к вирусной инфекции. За последние годы в этом направлении был сделан заметный рывок, что напрямую связано с более детальным пониманием организации генома и функционирования вирусных генов. В настоящее время для получения растений, устойчивых к вирусной инфекции, с помощью генно-инженерных технологий существует ряд подходов, позволяющих получить трансгенные растения, трансформированные геном белка оболочки вируса, что приводит к уменьшению инфицированности<sup>TM</sup> и ингибированию размножения вируса. Таким методом были получены растения табака и картофеля, трансформированные геном белка оболочки вируса табачной мозаики, что привело к появлению стойкого антивирусного эффекта у трансгенных растений.

В настоящее время получены линии табака, которые, помимо устойчивости к ВТМ, резистентны к вирусу тыквенной мозаики. Были также получены растения картофеля и кукурузы, устойчивые к вирусам скручивания листьев, и растения ячменя, резистентные к вирусу карликовости. Также получен и выращивается сорт тыквы, обладающий устойчивостью сразу к трем вирусам.

Еще одним подходом к получению устойчивых к патогенам растений является трансформация растительных клеток генами, кодирующими ферменты пути биосинтеза фитоалексинов, проявляющих фунгицидное и антимикробное действие. Трансформация этими генами растений томата и картофеля значительно повысила устойчивость к фитофторозу и фузариозу, а табака — к серой гнили.

В настоящее время получены четыре трансгенных коммерческих сорта картофеля, устойчивые к Y вирусу (PVY) и вирусам скручивания листьев (PLRV), сорт тыквы, устойчивый одновременно к трем различным вирусам, сорт папайи, устойчивый к круговому вирусу папайи (PRV).

*Получение трансгенных растений, устойчивых к гербицидам.*

Одним из основных направлений биотехнологии растений является получение культурных растений, устойчивых к воздействию гербицидов. Гербициды широкого спектра действия, уничтожая сорные травы, оказывают угнетающее действие и на посевы. Получение устойчивых к гербицидам растений ведется в двух направлениях: во-первых, прямая селекция устойчивых к гербицидам форм растений (в основном, путем скрещивания с дикими видами растений, устойчивых к гербицидам), во-вторых, получение трансгенных растений путем введения генов, экспрессия которых приводит к гербицид-резистентности. Теоретической основой получения трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, являются данные о молекулярных механизмах возникновения устойчивости к гербицидам и выделения генов как бактериального, так и растительного происхождения, определяющих этот признак. Действие гербицидов проявляется в подавлении метаболизма растительных клеток: ингибировании биохимических процессов прежде всего фотосинтеза (атразин, симазин, диурон) и синтеза аминокислот (глифосат, сульфонилмочевина, биалафос). Устойчивость к гербициду возникает либо в результате изменения сродства гербицида с его ферментом-мишенью, либо непосредственно ингибированием молекулы гербицида.

Получение растений, устойчивых к гербицидам, методами генной инженерии прежде всего основывается на изучении молекулярных механизмов толерантности и включает следующие этапы: выявление мишеней действия гербицидов в клетке растений, отбор растений/бактерий, устойчивых к данному гербициду (в качестве источника генов резистентности), идентификация и клонирование этих генов, изучение их экспрессии для использования в трансгенных конструкциях.

Действие гербицида атразина основано на его связывании с хлоропластным мембранным белком (&), который кодируется геном *pbcsA*. Ген *pbcsA* был выделен из генома некоторых сорняков. Было показано, что устойчивость к гербициду связана с возникновением точечной мутации в гене *pbcsA*, что приводит к замене в белке аминокислотного остатка серина на глицин. Такие замены в белке  $Q_b$  приводят к резкому уменьшению связывания гербицида с ферментом-мишенью. В результате

возникает устойчивость к гербициду. Мутантный ген *pbca* был встроен в векторные конструкции для трансформации растений. Полученные трансгенные растения были устойчивы к атразину.

Аналогично было показано, что замена аланина на аргинин в белке EPSP-синтетазы, который кодируется геном *aroA E. coli*, приводит к возникновению устойчивости к действию гербицида глифосата. Это было использовано для трансформации клеток табака, томатов, сахарной свеклы и картофеля мутантным геном *agoA* и получения трансгенных растений, устойчивых к гербициду.

Введение в геном растений бактериального гена *bar* приводит к появлению устойчивости к гербициду BASTA. Было показано, что белок, кодируемый -геном, – фосфинотрицинацетилтрансфераза — ацетирует активный компонент гербицида фосфинотрицин, что приводит к его инактивации. Получены сорта трансгенного риса (1995), сорго (1995), пшеницы (1994) и ряда других растений. В последнее время *bar*-ген стал использоваться и в качестве селективного маркера в генно-инженерных векторах.

Введение в геном риса гена, кодирующего фермент протопорфириногенсинтетазу (Protox), выделенного из бактерий *B. subtilis*, привело к повышению устойчивости трансгенных растений к гербицидам дифенил-эфирового ряда. При этом был показан механизм анти- гербицидного действия: повышенная экспрессия этого белка Protox нейтрализует действие гербицида, чем и обусловлено повышение устойчивости к нему. При этом была показана прямая зависимость между числом встроенных копий гена и уровнем устойчивости.

В настоящее время в странах Северной Америки и Европе разрешены к применению более 20 сортов трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, таких важных сельскохозяйственных культур, как кукуруза, хлопок, рис, соя, пшеница, картофель, томаты, лен. Проходят полевые испытания трансгенные сорта клубники, сахарной свеклы и некоторых цветочных культур. Всего в мире трансгенными сортами и гибридами, устойчивыми к гербицидам, засеяно около 34 млн. гектаров, или 80 % всех посевов трансгенных сортов.

В целом можно говорить о том, что получение трансгенных растений является одним из наиболее бурно развивающихся направлений биотехнологии. К февралю 2001 г. в странах с разрешенным использованием генетически модифицированных растений были проведены испытания и разрешены к коммерческому использованию 78 сортов трансгенных растений 18 возделываемых культур.

Быстрые темпы развития генной инженерии растений приводят к стремительному росту возделываемых площадей, занятых трансгенными растениями, с 1,6 млн/ га в 1996 г., когда началось их возделывание в коммерческих масштабах, до более 80 млн га в 2005 г., что составило около 5 % всех пахотных площадей в мире. Интересно отметить, что 99 % всех этих площадей занимают четыре основные трансгенные культуры: соя, кукуруза, рапс и хлопок. В 2004 г. трансгенными были в США около 75 % хлопка и сои, в Китае – 53 % хлопка, в Аргентине – 99 % сои, в Канаде – 63 % рапса. В 2003 г. 75 % всех выращиваемых трансгенных растений содержали ген устойчивости к гербицидам, 21 % – ген устойчивости к вредителям и почти 8 % – более одного гена устойчивости.

## 4. КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ.

### *Культура клеток и тканей.*

Основная форма существования жизни – клетка, в которой протекают все физиологические процессы как у одноклеточных, так и у многоклеточных организмов. Рост и размножение организмов связаны с образованием новых клеток. Совокупность биохимических процессов, обеспечивающих рост и развитие клетки, называется *обменом веществ*, или *метаболизмом*. Каждая клетка на определенной стадии делится и дает начало двум дочерним клеткам. Клетки разнообразны по форме, величине, степени дифференциации и функциям.

Клетка является элементарной единицей жизни: в ней имеется все необходимое для поддержания обмена веществ и размножения. Соматические и половые клетки многоклеточных животных и растений, а также одноклеточные организмы сходны по строению. Среди живых организмов встречаются два типа организации клеток. Наиболее простое строение имеют клетки бактерий и сине-зеленых водорослей, которые объединяются в *прокариотическую группу*. У них нет морфологически выраженного ядра. Клетки всех остальных представителей живого мира относятся к *эукариотической группе*, потому что у них обязательной структурой является клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой. Кроме ядра и вакуолей, в цитоплазме существует целый набор специальных структур, или органелл, выполняющих специфические функции.

Клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению *in vitro*, их тотипотентности и регенерации. Метод культивирования изолированных тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) применяют в растениеводстве для сохранения и размножения ценных генотипов, в эмбриогенезе, оздоровлении посадочного материала, для получения продуктов вторичного метаболизма, в создании форм растений, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды, и т. д.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в трех направлениях.

Первое направление связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности вещества вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Как правило, вторичные вещества получают из каллусной ткани, выращенной на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде. На основе клеточных технологий получают такие медицинские препараты, как диосгенин из клеток диоскореи, аймолин из клеток раувольфии змеиной, тонизирующие вещества из клеток женьшеня, используемые в медицине и парфюмерии. Продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимуществом такого способа получения веществ вторичного синтеза является также возможность использовать для

этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

Второе направление — это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Третье направление — использование изолированных клеток в селекции растений, дающее возможность получать быстрорастущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды: засуха, засоление, низкие и высокие температуры, фитопатогены, тяжелые металлы и др. Вместе с тем это направление предусматривает создание новых растений путем слияния изолированных протопластов и получения неполных (соматических) гибридов. Перенос в изолированные протопласты чужеродных генов методами генной инженерии позволяет получать в дальнейшем растения с новыми наследуемыми свойствами. Культивирование изолированных пыльников и семяпочек на искусственных питательных средах дает возможность получать гаплоиды, культивирование зародышей позволяет получать растения из невсхожих (с плохо развитым эндоспермом) гибридных семян. Оплодотворение в пробирке позволяет преодолеть нескрещиваемость некоторых растений.

Успех в применении культуры клеток и тканей в первую очередь зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и регенерацию из них взрослых растений. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток. В первую очередь это касается злаковых растений. Поэтому важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерации и лежащих в их основе процессов.

Попытки культивировать изолированные от растений ткани делались давно, и в истории развития этого метода можно выделить несколько этапов.

I этап (1892–1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Г. Хаберландт, Х. Фёхтинг, С. Рехингер. Они пытались культивировать в растворе сахарозы различные растительные ткани. Для сегментов стеблей одуванчика и тополя был получен первичный каллус и определен минимальный размер сегмента, способного к каллусогенезу. Не достигнув положительных результатов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, которые подтвердились значительно позже. Так, Г. Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки, т. е. способности клеток реализовывать свой потенциал развития и давать начало образованию целого растения при определенных условиях культивирования.

II этап (1902–1922 гг.) ознаменовался созданием первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти среды были природного происхождения и содержали, как правило, плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались неудачными, так как в экспериментах использовались мало подходящие для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

Ш этап (1922–1932 гг.). В этот период независимо друг от друга американский ученый В. Робине и немецкий ученый В. Котте показали возможность культивирования на твердых питательных средах меристемы кончиков корня томатов и кукурузы. Однако через определенное время растительные ткани бурели и погибали. Подлинное развитие метода культуры тканей растений началось с 1932 г.

IV этап (1932–1940 гг.) связан с именем французского ученого Р. Готре, который показал возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду. Это открытие дало новый толчок в работе по культуре ткани, который ознаменовался нарастающим числом новых объектов, успешно введенных в культуру.

V этап (1940–1960 гг.). С открытием в 1955 г. нового класса фитогормонов-цитокенинов, и в частности, кинетина, была получена возможность стимулировать деление клеток кусочка ткани сердцевинной паренхимы табака, лишенной проводящих пучков и камбия.

В зависимости от концентрации и соотношения стимуляторов роста можно было усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. В этот период было оценено положительное действие натуральных экстрактов типа эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений для поддержания неорганизованного клеточного роста и стимуляции процессов морфогенеза в культуре каллусных тканей и клеточных суспензий.

VI этап (1960–1975 гг.). Наиболее важным событием этого периода была разработка профессором Ноттингемского университета Э.К. Коккингом метода получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях. Позже в 1970 г. в той же лаборатории С. Пауэром и сотрудниками было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. В этот же период разработан метод клонального микроразмножения растений в условиях *in vitro* с использованием меристемной культуры. Основоположником данного направления был французский ученый Ж. Морель, который получил оздоровленный посадочный материал орхидей и картофеля.

VII этап (1975 г.– по настоящее время). Продолжается быстрое развитие техники *in vitro*, изучение биологии культивируемых объектов, разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, методы мутагенеза и клеточной селекции, методы получения гаплоидных растений, совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti- и Ri-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*. При помощи методов генной инженерии разработан эффективный метод переноса генов для двудольных растений. Таким образом, за последние десятилетия был сделан большой шаг вперед в развитии технических приемов работы с изолированными тканями и клетками растений. Однако объектом исследования, как правило, служили одно- и двудольные травянистые растения и в редких случаях — древесные.

### *Технологии in vitro и культивирование изолированных протопластов.*

Необходимым условием работы с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности. Богатая питательная среда является прекрасным субстратом для развития в ней микроорганизмов, а изолированные от растения фрагменты (экспланты), которые помещают на питательную среду, легко поражаются микроорганизмами. Поэтому надо стерилизовать как эксплант, так и питательную среду. Все манипуляции с изолированными тканями (введение в культуру, пересадка на свежую питательную среду) проводят в асептическом помещении (ламинар-боксе) стерильными инструментами. Стерильность надо соблюдать и во время культивирования изолированных тканей, особенно при перепаде температуры и влажности, так как при этом пробки становятся влажными и по ним в пробирку могут проникать микроорганизмы.

Стерилизацию экспланта и семян проводят, выдерживая их 5 – 20 мин в стерилизующих растворах с последующей многократной промывкой экспланта стерильной водой. Время стерилизации зависит от характера экспланта и от стерилизующей активности раствора. Семена стерилизуют 10–20 мин, а вегетативные части 5–10 мин.

Органы растений, из которых берут эксплант для введения в культуру, предварительно моют щеткой в мыльном растворе и споласкивают дистиллированной водой, а затем погружают на несколько секунд в 70 %-й этанол. Семена погружают в спирт на 1–2 мин. Кроме собственно стерилизующего действия спирта обработка тканей этанолом перед помещением в основной стерилизующий раствор повышает стерилизующий эффект последнего.

После стерилизации растительные объекты должны быть тщательно промыты стерильной водой.

Поверхностная стерилизация освобождает эксплант только от наружной инфекции. Если же ткани экспланта имеют внутреннюю инфекцию, то его необходимо обработать антибиотиками. Особенно богаты внутренней инфекцией ткани тропических и субтропических растений с крупными сосудами. Загрязнение культур грибами или бактериями обычно выявляется через 1–14 дней после посадки. Загрязненные культуры необходимо тотчас же удалить, чтобы избежать заражения воздуха в световой комнате.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 0,75–1 атм в течение 20 мин. 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.

Посуду, предварительно завернутую в фольгу или оберточную бумагу, стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при 160 °С в течение двух часов.

*Питательные среды* для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, магний, серу, железо) и микроэлементы (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.), а также витамины, углеводы, фитогормоны или их синтетические аналоги. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина,



аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиамин-тетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток.

Для получения каллусной ткани в отдельных случаях к питательной среде добавляют жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), каштана и др.

Углеводы являются необходимым компонентом питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве углевода используют сахарозу или глюкозу в концентрации 2–3 %.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому 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.

На безгормональной среде растут опухолевые и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим гормонам или к одному из них связана со способностью этих клеток синтезировать гормоны.

В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), а-нафтилуксусную кислоту (НУК). Для получения рыхлого хорошо растущего каллуса чаще применяют 2,4-Д, так как ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д.

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

В настоящее время известно большое число различных 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, соотношением аммонийного и нитратного азота.

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 многократно их использовать. Концентрированные (маточные) растворы хранят в холодильнике.

*Условия культивирования.* Для успешного культивирования изолированных клеток и тканей растений необходимо соблюдать определенные условия выращивания. Большинство каллусных тканей не нуждается в свете, так как не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно. Исключение составляют некоторые зеленые каллусные ткани, такие, как каллусная ткань мандрагоры. В некоторых

случаях каллусные ткани, не способные к автотрофному питанию, все же выращивают на непрерывном освещении, что является необходимым условием дальнейшего успешного морфогенеза, как у люцерны. Большинство же каллусных тканей получают в темноте или при рассеянном свете.

Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далее культивируют их при освещенности 1000–4000 лк.

Культивирование изолированных меристем и их микроразмножение также происходит на свету. Освещенность факторостатной (световой) комнаты должна составлять в зависимости от культуры 3000–10 000 лк. Необходимо учитывать фотопериод, который требуется для данного культивируемого объекта. Влажность в световой комнате должна составлять 60–70 %. Более сухой воздух способствует усыханию питательной среды в пробирках и колбах, если они закрыты ватными пробками, изменению ее концентрации и нарушению условий культивирования. Для повышения влажности в комнате можно использовать поддоны с водой.

Оптимальная температура для большинства культивируемых тканей 25–26 °С, для культуры тканей тропических растений она может достигать 29–30 °С. В случае индукции морфогенеза температуру понижают до 18–20 °С.

Наилучшие световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать при помощи климатических камер.

### ***Клональное микроразмножение растений.***

Для семенных растений характерно два способа размножения: семенной и вегетативный. Оба эти способа имеют как преимущества, так и недостатки. К недостаткам семенного размножения следует отнести, в первую очередь, генетическую пестроту получаемого посадочного материала и длительность ювенильного периода. При вегетативном размножении сохраняется генотип материнского растения и сокращается продолжительность ювенильного периода. Однако для большинства видов (в первую очередь для древесных пород) проблема вегетативного размножения остается до конца не решенной. Это обусловлено следующими причинами: 1) не все породы, даже на ювенильной стадии, могут размножаться вегетативным способом с требуемой эффективностью (дуб, сосна, ель, орехоплодные и др.); 2) практически невозможно черенкованием размножить многие виды древесных пород в возрасте старше 10–15 лет; 3) не всегда удается получать стандартный посадочный материал (возможность накопления и передачи инфекции); 4) трудоемкостью и сложностью операций при размножении взрослых (древесных) растений при помощи прививок; 5) неэффективностью разработанных технологий для получения необходимого количества генетически однородного материала в течение года.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – клонального микроразмножения (получение в условиях *in vitro* (в пробирке), неполовым путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру). В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей

тотипотентность, т. е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму. Этот метод, несомненно, имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;
  - освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
  - высокий коэффициент размножения ( $10^5$ – $10^6$  – для травянистых, цветочных растений,  $10$  –  $10^5$  – для кустарниковых древесных,  $10^4$  – для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

Первые достижения в области клонального микроразмножения были получены в конце 50-х годов XX столетия французским ученым Жоржем Морелем, которому удалось получить первые растения-регенеранты орхидей. Успеху Ж. Мореля в микроразмножении способствовала уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*. Как правило, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы, одуванчика, салата и изучали влияние состава питательной среды на процессы регенерации и формирования растений. Ж. Морель в своих работах также использовал верхушку цимбидиума (сем. орхидные), состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых зачатков, из которой при определенных условиях наблюдал образование сферических сфер – протокормов. Сформировавшиеся протокормы можно было делить и затем культивировать самостоятельно на вновь приготовленной питательной среде до образования листовых примордиев и корней. В результате им было обнаружено, что этот процесс бесконечен и можно получать в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 60-х годах XX в. в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Под руководством проф. Р.Г. Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и некоторых других растений и предложены промышленные технологии.

Таким образом, первые успехи в клональном микроразмножении связаны с культивированием апикальных меристем травянистых растений на соответствующих питательных средах, обеспечивающих в конечном итоге получение растений-регенерантов.

Однако область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению. Это в первую очередь относится к размножению *in vitro* взрослых древесных пород, особенно хвойных, и

использованию техники *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений. В настоящее время в этом направлении наметился положительный сдвиг.

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов XX столетия и связаны с именем французского ученого Р. Готре. В них сообщалось о способности камбиальных тканей некоторых видов вяза и сосны к каллусогенезу *in vitro*. В последующих работах 40-х годов было выяснено о способности различных тканей вяза листового к образованию адвентивных почек. Однако дальнейший рост и формирование побегов авторами не были получены. Лишь к середине 60-х годов Э. Матесу удалось получить первые растения-регенеранты осины, которые были доведены до почвенной культуры. Культивирование тканей хвойных пород *in vitro* долгое время не использовалось как объект исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования ювенильных и тем более взрослых тканей, изолированных с растения. Известно, что древесные, и особенно хвойные, характеризуются медленным ростом, трудно укореняются, содержат большое количество вторичных соединений (фенолы, терпены и другие вещества), которые в изолированных тканях окисляются различными фенолазами. В свою очередь, продукты окисления фенолов обычно ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности тканей древесных пород к регенерации адвентивных почек, которая с возрастом растения-донора постепенно исчезает полностью. Однако, несмотря на все трудности, ученые все чаще используют в качестве объектов исследований различные ткани и органы древесных растений. В настоящее время насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые были размножены *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, осина, гибриды тополей с осинкой, сосна, ель, секвойя и др.), а работы в этом направлении ведутся в научных учреждениях Москвы, Санкт-Петербурга, Воронежа, Уфы, Новосибирска, Архангельска, Киева, Одессы, Ялты и др.

*Этапы и методы клонального микроразмножения растений.* Процесс клонального микроразмножения можно разделить на четыре этапа: 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры; 2) собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мериклонов; 3) укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°, + 10 °С); 4) выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Существует много методов клонального микроразмножения. Различные авторы, проводя индивидуальные исследования по влиянию условий культивирования эксплантов на процессы морфогенеза, наблюдали разные ответные морфогенетические реакции на изменение условий выращивания, что в свою очередь привело к созданию новых классификаций методов клонального микроразмножения. Исходя из предложенных в литературе методов микроразмножения растений, этот процесс возможно осуществлять следующими

путями:

- активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки и интеркамерные зоны стебля);
- индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- индукция соматического эмбриогенеза;
- дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях.

Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений, — это активация развития уже существующих в растении меристем, основывающийся на снятии апикального доминирования (рис. 3.11). Это может быть достигнуто двумя путями: а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде; б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2ip) и зеатин. Полученные таким образом побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур как технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис), так и овощных (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.), а также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздика, хризантема, роза, гербера), тропических и субтропических растений (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.), плодовых и ягодных культур (яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.) и древесных растений (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.). Для некоторых сельскохозяйственных культур, таких, как картофель, технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более  $10^5$  растений в год, причем технология предусматривает получение в пробирках микроклубней — ценного безвирусного семенного материала.

Второй метод — это индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и таким образом регенерировать целые растения. Образование адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если их удастся получить свободными от инфекции. Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих один цитокинин или в сочетании с ауксином, находящихся в соотношении 10:1 или 100 : 1. В качестве ауксина в этом случае наиболее часто используют р-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) или α-нафтилуксусную кислоту

(НУК). Это наиболее распространенный метод микроразмножения высших растений, которым были размножены многие луковичные цветочные растения (нарциссы, лилии, гиацинт, гладиолусы, тюльпаны) из луковичных чешуй, сегментов базальной части донца луковиц, эксплантов листьев; представители рода *Brassica* (капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи — из сегментов гипокотыля, семядолей, листьев; лук, чеснок — из верхушечной меристемы, ткани донца луковиц; томаты — из апикальных или пазушных меристем; салат цикорный — из сегментов листовых пластинок; петуния — из сегментов корней; глоксиния, фиалки — из сегментов листовых пластинок, а также некоторые представители древесных растений — из изолированных зрелых и незрелых зародышей.

Хорошо разработана технология клонального микроразмножения земляники, основанная на культивировании апикальных меристем. Меристематические верхушки изолируют из молодых свободных от вирусных болезней растений и выращивают на модифицированной питательной среде Т. Мурасига и Ф. Скуга, содержащей БАП в концентрации 0,1–0,5 мг/л. Через 3–4 недели культивирования меристема развивается в проросток, в основании которого формируются адвентивные почки, которые быстро растут и дают начало новым почкам. В течение 6–8 недель образуется конгломерат почек, связанных между собой соединительной тканью и находящихся на разной стадии развития. Появляются листья на коротких черешках, в нижней части которых формируются новые адвентивные почки. Эти почки разделяют и пересаживают на свежую питательную среду. На среде с цитокинином продолжается пролиферация придаточных побегов, а на среде без регуляторов роста в течение 4–6 недель формируются нормальные растения с корнями и листьями.

Морфогенетическая активность экспланта сохраняется в течение 3–4 лет. Таким образом, от одного материнского растения можно получать несколько миллионов растений-регенерантов в год.

Несомненный интерес у исследователей вызывает вопрос, связанный с происхождением адвентивных почек, и, в частности, какие клеточные слои участвуют в дифференциации меристем. Единого мнения по этому вопросу пока нет. Так, Тран Тан Ван в своих работах с тканями табака показала, что именно эпидермис является наиболее активной тканью, способной образовывать почки, каллус или корни в зависимости от гормонального баланса питательной среды. Цитологические исследования, проведенные на сегментах базальной части донца луковиц тюльпанов и нарциссов показали, что адвентивные побеги формируются из поверхностных слоев меристематических клеток, прилегающих к донцу, а для растений глоксинии процесс формирования адвентивных почек, как правило, происходит в субэпидермальных клеточных слоях листовых пластинок. Единого мнения по этому вопросу также нет и среди исследователей, работающих с древесными растениями. Так, было показано, что образование почек на изолированной хвое ели обыкновенной происходит в эпидермальном слое культивируемого экспланта, для псевдотсуги — в субэпидермальных слоях, а при культивировании семядолей сосны замечательной на среде, содержащей один цитокинин (БАП), этот процесс происходит одновременно как в эпидермальном, так и в субэпидермальном слоях.

Для сосны обыкновенной также было отмечено образование адвентивных почек в эпидермальном и субэпидермальном слоях семядолей зародыша, и этот процесс для сосны не зависит от применяемых цитокининов.

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название — соматический эмбриогенез. Основное отличие образования зародышей *in vitro* от *in vivo* (в естественных условиях) заключается в том, что соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему внешнему виду напоминают биополярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня. Согласно Ф. Стэварду, соматические зародыши проходят три стадии развития: глобулярную, сердцевидную, торпедовидную и в конечном итоге имеют тенденцию к развитию в проросток. Это явление впервые было отмечено в культуре клеток моркови еще в середине 50-х годов XX в., а в настоящее время используется для размножения большинства растений из семейства *Orchidaceae* и *Rutaceae*, некоторых представителей злаковых (пшеница, ячмень), люцерны, редиса, винограда, а также некоторых видов древесных пород (осина, эвкалипт, дуб, ель обыкновенная).

Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в два этапа. На первом этапе клетки экспланта дифференцируются за счет добавления в питательную среду ауксинов, как правило, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и превращаются в эмбриональные. Наследующей стадии необходимо заставить сформировавшиеся клетки развиваться в эмбриоиды, что достигается уменьшением концентрации ауксина или полного его исключения из состава питательной среды. Соматический эмбриогенез возможно наблюдать непосредственно в тканях первичного экспланта, а также в каллусной культуре. Причем последний способ менее пригодный при клональном микроразмножении, так как посадочный материал, полученный таким методом, будет генетически нестабилен по отношению к растению-донору. Как правило, соматический эмбриогенез происходит при культивировании каллусных клеток в жидкой питательной среде (суспензия) и является наиболее трудоемкой операцией, так как не всегда удается реализовывать свойственную клеткам тотипотентность. Однако этот метод размножения имеет свои преимущества, связанные с сокращением последнего (третьего) этапа клонального микроразмножения, не требующего подбора специальных условий укоренения и адаптации пробирочных растений, так как соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растеньица. При использовании соответствующей техники их капсулирования из этих эмбриоидов возможно получать искусственные семена.

Четвертый метод клонального микроразмножения — дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях. Он мало используется для получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при периодическом пересаживании каллусной ткани на свежую питательную среду часто наблюдаются явления, нежелательные при микроразмножении: изменение ploидности культивируемых клеток, структурные перестройки хромосом и

накопление генных мутаций, потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками. Наряду с генетическими изменениями растений наблюдаются и морфологические: низкорослость, неправильное жилкование листьев и их расположение по стеблю, образование укороченных, утолщенных междоузлий, уродливость, пониженная устойчивость к болезням и вредителям. Причем длительное культивирование каллусных клеток усугубляет эти изменения, поэтому период неорганизованного роста при микроразмножении должен быть сведен к минимуму.

Однако, несмотря на некоторые недостатки, данный метод имеет положительные стороны и преимущества. Во-первых, он является эффективным и экономически выгодным, так как в процессе размножения из каждой индивидуальной каллусной клетки при благоприятных условиях культивирования может сформироваться адвентивная почка, дающая начало новому растению. Во-вторых, в ряде случаев он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. В-третьих, представляет большой интерес для селекционеров, так как растения, полученные данным методом, различаются генетически и морфофизиологически. Это дает возможность селекционерам проводить отбор растений по хозяйственно-важным признакам и оценивать их поведение в полевых условиях. Этот метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а варибельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и другие культуры. Через каллусную культуру были размножены сахарная свекла, некоторые представители рода *Brassica*, кукуруза, рис, пшеница и другие злаковые, подсолнечник, лен, разработаны условия, способствующие регенерации растений из каллуса огурца, картофеля, томатов.

*Оздоровление посадочного материала от вирусов.* Основное преимущество клонального микроразмножения – это получение генетически однородного, безвирусного посадочного материала. Этого возможно достичь, используя меристемные ткани апексов и пазушных почек органов стеблевого происхождения. Как правило, меристема состоит из конуса нарастания, а также одного или двух листовых зачатков (примордиев) и является свободной от инфекции.

Предположение о возможности отсутствия вирусов в меристематических тканях больных растений впервые высказано Н. Чунгом (1938) и П. Р. Уайтом (1943). Начиная с 50-х годов XX века были предприняты первые успешные опыты по получению свободных от вирусов растений георгина из точки роста. Авторы этого метода Ж. Морель и С. Мартин полагали, что в больном растении вирус распространяется с отставанием от быстро растущих молодых органов, особенно в молодых недифференцированных тканях, где концентрация вируса может снижаться, вплоть до полного отсутствия. Теоретические концепции, положенные в основу этого метода, стали проясняться в последнее время.

Структурной основой используемого на практике явления служит специфика строения точки роста растений; дистальная ее часть, представленная апикальной меристемой, у разных растений имеет средний диаметр до 200 мкм и высоту от 20



до 150 мкм. В более нижних слоях дифференцирующиеся клетки меристемы образуют прокамбий, дающий начало пучкам проводящей системы. Известно, что успех клонального микроразмножения зависит от размера меристематического экспланта, чем больше листовых зачатков и тканей стебля, тем легче идет процесс морфогенеза, заканчивающийся получением целого, нормального пробирочного растения. Вместе с тем зона, свободная от вирусных частиц, очень различна для разных вирусов. Это зависит также от вида и сорта растения. В колеоптиле злаков, например, размеры участка верхушки, не содержащей сосуда, могут достигать до 250 мкм. Такая особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса путем быстрого транспортирования по проводящей системе, но допускает возможность медленного распространения через плазмодезмы, соединяющие меристематические клетки. При культивировании апикальной меристемы картофеля величиной 200 мкм на питательной среде и дальнейшее получение из нее растений-регенерантов показали, что среди полученных растений только 10 % были свободны от X-вируса, но 70 % – от Y-вируса.

Применение электронной микроскопии часто обнаруживает наличие вирусов в меристеме пораженных ими растений, это, впрочем, подтверждает общеизвестный факт, что число лишенных вируса растений после подобной операции чрезвычайно мало, и многие меристемы пораженных растений инфекционны.

Таким образом, эффективность применения апикальной меристемы в качестве метода оздоровления зараженных вирусами растений оказывается низкой. Это было доказано результатами, полученными рядом меристемных лабораторий Российской Федерации и Крыма, показывающими, что из апикальных меристем растений гвоздики, цимбидиума, пораженных вирусами CarMV и CarVMV, в условиях *in vitro* получают инфицированные мериклоны.

Практически возможно получение безвирусной апикальной меристемы от больного растения, но при этом риск попадания вирусов в здоровые ткани должен быть снижен до нуля. Это может быть достигнуто путем применения предварительной термотерапии исходных растений или хемотерапии.

Метод термотерапии применяется как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* и предусматривает использование сухого горячего воздуха. Для объяснения механизма освобождения растений от вирусов в процессе термотерапии существуют различные гипотезы. Согласно одной из них, высокие температуры воздействуют непосредственно на вирусные частицы через их рибонуклеиновую кислоту и белковую оболочку, вызывая физическое разрушение и лишая вирусные частицы инфекционности. Вторая гипотеза состоит в том, что высокая температура действует на вирусы через метаболизм растений. Под влиянием высоких температур нарушается равновесие между синтезом и деградацией вирусных частиц. Если преобладает синтез, то концентрация вируса в зараженных тканях растет, и наоборот.

Растения, подвергающиеся термотерапии, помещают в специальные термокамеры, где в течение первой недели повышают температуру от 25 до 37 °С путем ежедневного увеличения температуры на 2 °С. Не менее важно при

термотерапии создавать и поддерживать на протяжении всего процесса оптимальные режимы: температуру 37 °С, освещенность лампами дневного света 5 тыс. лк, фотопериод в зависимости от культуры 14–16 ч в сутки при относительной влажности воздуха в термокамере 90 %.

Продолжительность термотерапии всецело зависит от состава вирусов и их термостойкости. Если, например, для гвоздики достаточно 10 – 12-недельного воздействия теплом, то для освобождения хризантемы от Б-вируса этот период длится 12 недель и более. Однако существуют растения, например луковичные культуры, цимбидиум, розы и другие, рост которых угнетается в результате длительной термотерапии *in vivo*. Для таких растений целесообразно проводить термотерапию растений-регенерантов *in vitro*.

Помимо положительного действия термотерапии на освобождение растений от вирусов выявлен положительный эффект высоких температур на точку роста и процессы морфогенеза некоторых цветочных культур (гвоздики, хризантемы, фрезии) в условиях *in vitro*. Применение термотерапии позволяет увеличить коэффициент размножения на 50–60 %, повысить адаптацию пробирочных растений-регенерантов к почвенным условиям, а также получить более высокий процент безвирусных маточных растений.

Применение термотерапии в сочетании с меристемной культурой позволяет оздоровить более 70 % растений-регенерантов хмеля от вирусного хлороза, 90 % растений земляники, 25 % – черной и красной смородины, 50 % – малины, более 80 % – картофеля. Проверку растений на наличие вирусов, как правило, проводят при помощи иммуноферментного анализа, электронной микроскопии и травянистых растений-индикаторов.

Другой способ, применяемый для освобождения растений от вирусов, – хемотерапия. Он заключается в добавлении в питательную среду, на которой культивируют апикальные меристемы, аналога гуанозина – 1(3-Д-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоскимид (коммерческое название вирозол) в концентрации 20—50 мг/л. Это противовирусный препарат широкого спектра действия. При использовании вирозола в культуральной среде процент безвирусных меристемных растений для ряда обычных для этих растений вирусов увеличивался до 80–100 % при 0–41 % в контроле. Положительные результаты хемотерапии были получены для сливы, черешни, малины, некоторых цветочных и других растений. Термо- и хемотерапевтические методы оздоровления посадочного материала от вирусов экономически малоэффективны. Поэтому в настоящее время с помощью методов трансгеноза создаются формы растений с генетической устойчивостью к вирусам.

## **5. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ В СИМБИОТИЧЕСКОЙ АЗОТФИКСАЦИИ.**

### ***Гены азотфиксации и их регуляция.***

Азотфиксаторы не составляют какого-либо определенного таксона микроорганизмов. Они встречаются во всех основных группах прокариот: среди

грамотрицательных и грамположительных эубактерий, цианобактерий, актиномицетов и архебактерий. Большинство азотфиксирующих микробов являются diaзотрофами, т. е. могут использовать N<sub>2</sub> в качестве единственного источника азота. В то же время некоторые азотфиксаторы могут фиксировать N<sub>2</sub> лишь в симбиозе с растениями (*Rhizobium*, *Frankia*). И наконец, ряд микробов (*Azorhizobium*, *Anabaena*, *Nostoc*) совмещает способность к diaзотрофии и к симбиозу с растениями.

*Синтез и выделение сигналов.* Образование симбиоза клубеньковых бактерий и бобовых растений начинается с реакции ризобий на растительные флавоноиды, которые активируют бактериальные гены вирулентности (*nod*, от англ. nodulation — клубенькообразование). Под контролем этих генов ризобии синтезируют липо-хито-олигосахаридные Nod-факторы, которые инициируют ранние стадии развития клубеньков. К настоящему времени у ризобий найдено более 50 генов вирулентности. Одни из этих генов являются «общими» (структурно и функционально гомологичными) для всех ризобий, а другие — специфичны для каждого вида или даже штамма. Мутации в «общих» *nod*-генах (*nodA*, *nodB*, *nodC*) приводят к нарушению самой ранней стадии развития симбиоза — скручивания корневых волосков. При мутациях генов хозяйской специфичности (*nodH*, *nodP*, *nodQ*, *nodZ*, *nodX*) обычно нарушаются более поздние стадии взаимодействия, связанные с формированием инфекционных нитей и клубеньковых меристем. Важные различия между этими группами генов вирулентности выявляются и при переносе их между разными видами ризобий. Перенос генов хозяйской специфичности обычно приводит к тому, что штамм-реципиент приобретает способность формировать клубеньки у растений-хозяев штамма-донора. При переносе «общих» *nod*-генов такого эффекта не наблюдается, однако если реципиентом являлся авирулентный мутант с нарушением собственных «общих» *nod*-генов, то у него наблюдается восстановление способности формировать клубеньки на исходных растениях-хозяевах.

Гены обеих групп являются индуцибельными: их активность первоначально удавалось зарегистрировать только после попадания ризобий в ризосферу растения. При этом флавоноиды, выделяемые в почву семенами или корнями бобовых, взаимодействуют с бактериальным белком NodD, который в результате приобретает способность активировать транскрипцию остальных *nod*-генов (*nodD* — единственный конститутивно работающий ген вирулентности ризобий). Ген *nodD* является представителем семейства регуляторов транскрипции, куда относятся такие хорошо изученные гены, как *lysR* и *agaC*. В белке NodD выявлено два домена: наиболее консервативный N-концевой, который связывается с ДНК, и менее консервативный C-концевой, который предположительно взаимодействует с флавоноидами. Белок NodD связан с внутренней мембраной ризобиальной клетки, через которую проникают флавоноиды. Взаимодействуя с ними, белок NodD изменяет свою конформацию, в результате чего становится возможным его связывание с консервативной последовательностью «*nod-box*», расположенной в промоторах индуцибельных генов вирулентности. В результате повышается сродство этих промоторов к РНК-полимеразе и индуцируется их транскрипция.

Конечным продуктом действия генов вирулентности являются Nod-факторы, способность к синтезу которых — уникальное свойство ризобий. Эти факторы представляют собой модифицированные липохито-олигосахариды, которые состоят из 3–6 остатков N-ацетилглюкозамина и радикала ненасыщенной жирной кислоты, содержащего 16–20 атомов углерода. Биосинтез этих факторов включает следующие процессы:

1) полимеризация N-ацетилглюкозамина (синтезируемых из фукозы под контролем белка NodM) с образованием 1–4-р-гликозидных связей. Эта реакция, катализируемая белком NodC, приводит к образованию олигомеров хитина;

2) деацетилирование «нередуцирующего» концевого остатка глюкозамина в положении R1 (катализируется блоком NodB) и последующее присоединение к атому азота жирнокислотного остатка (катализируется белком NodA);

3) модификации образовавшегося липохито-олигосахарид (коровая часть Nod-фактора): атомы водорода на «редуцирующем» и «нередуцирующем» концах замещаются на различные радикалы (фукозил, сульфат, метил, ацетил и др.).

Важно отметить, что эти стадии биосинтеза Nod-фактора контролируются разными группами *nod*-генов: синтез коровой части происходит под контролем «общих» *nod*-генов, а его модификация — под контролем генов хозяйской специфичности.

Очищенные Nod-факторы в концентрации всего  $10^{-8}$ — $10^{-12}$  М инициируют ранние стадии формирования симбиоза: скручивание корневых волосков, закладку клубеньковых меристем, а у некоторых бобовых (люцерна) — даже начальные стадии гистогенеза клубеньков. У *Vicia sativa* уже 5—10 мин воздействия Nod-факторов достаточно для начала деформации корневых волосков, которая проявляется через 1 ч, а через 3 ч в восприимчивых зонах корня может деформироваться более половины волосков. Первыми биохимическими реакциями, которые вызывают Nod-факторы, являются деполяризация клеточной мембраны корневого волоска (происходит через 10 мин после инокуляции), а также модуляция ионных потоков в клетках эпидермиса.

Важно отметить, что Nod-факторы — это те сигналы, которые в значительной степени определяют специфичность всего симбиотического взаимодействия. Наибольшую роль в этом играют модификации Nod-факторов, осуществляемые под контролем генов хозяйской специфичности. Так, сульфатирование положения R6 на «редуцирующем конце», характерное для ризобий люцерны (*R. meliloti*), необходимо для индукции ранних симбиотических реакций у «гомологичного» хозяина (люцерны), тогда как в отсутствие сульфатной группы наблюдают индукцию этих же реакций у вики. При мутациях, инактивирующих белок NodH, который катализирует сульфатирование, *R. meliloti* утрачивает вирулентность по отношению к люцерне, но приобретает вирулентность к вике, симбионты которой (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) лишены гена *nodH*.

### ***Бобово-ризобияльный симбиоз и повышение эффективности биологической фиксации азота.***

Симбиоз, образуемый бобовыми растениями (сем. *Fabaceae*) и клубеньковыми бактериями (ризобиями), – одна из наиболее изученных надорганизменных систем. Это обусловлено несколькими причинами. Ризобии (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*,

*Rhizobium*, *Sinorhizobium*) являются факультативными симбионтами, которые легко культивируются *ex planta* и доступны для изучения всеми современными молекулярно-генетическими методами. Клубеньки бобовых оказались очень удобной моделью для анализа ряда ключевых функций растения: сигнальных процессов и экспрессии генов, клеточной дифференцировки и органогенеза, азотного и углеродного обмена. И наконец, важным стимулом для изучения бобово-ризобиального симбиоза является его практическая значимость: многие бобовые относятся к числу важных сельскохозяйственных культур, повышение продуктивности которых весьма актуальная задача.

Взаимодействие ризобий и растений характеризуется высокой специфичностью. Она выражается, во-первых, в том, что образование симбиоза ограничено почти исключительно семейством бобовых; единственным небобовым, образующим клубеньки с ризобиями, является *Parasponia* (сем. *Ulmaceae*). Во-вторых, большинство ризобий вступают в симбиоз лишь с ограниченным кругом бобовых, относящихся к одному роду (*R. galegae*, *R. leguminosarum* *bs.trifolii*) или к нескольким таксономически близким родам (*Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* *bv. viceae*).

Развитие бобово-ризобиального симбиоза — сложный многостадийный процесс, который включает четыре группы процессов: ранние (преинфекционные) взаимодействия; морфогенез клубеньков; регуляция развития эндосимбионтов; функционирование клубеньков как органов азотфиксации. Все эти процессы находятся под строгим контролем как бактерий, так и растения-хозяина.

## 6. БИОТЕХНОЛОГИЯ КОРМОВЫХ ПРЕПАРАТОВ.

### *Получение кормовых белков.*

Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма, выполняющими жизненно важные функции: каталитические, регуляторные, транспортные, биоэнергетические, защитные от инфекции и действия стрессовых факторов, структурные, запасные и др. В вегетативной массе растений на долю белков приходится 5–15 % сухого вещества, в зерне злаков – 8–18 %, семенах масличных растений – 16–28 %, зерне зернобобовых культур – 20–40 %. В различных тканях организма человека и животных содержание белков обычно от 20 до 80 % их сухой массы.

Исходя из этого совершенно очевидно, что для образования клеток и тканей организма, а также поддержания его жизненных функций должен осуществляться постоянный синтез структурных и других форм белков. Для синтеза белковых молекул все живые организмы используют 18 аминокислот и два амида (аспарагин и глутамин). Однако после синтеза белков их молекулы могут подвергаться моди-

фикации, вследствие чего в составе белков обнаруживают до 26 аминокислот.

Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ – углекислоты, воды и минеральных солей, тогда как в организме человека и животных некоторые аминокислоты не могут синтезироваться и должны поступать в организм в готовом виде как компоненты пищи. Такие аминокислоты принято называть *незаменимыми*, к ним относятся валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин. Отсутствие в пище хотя бы одной незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека, а недостаток их в кормах снижает продуктивность сельскохозяйственных животных.

В связи с необходимостью обеспечения человека и животных незаменимыми аминокислотами разработаны научно-обоснованные нормы их суточного потребления. Так, ежедневная потребность человека в незаменимых аминокислотах составляет (г): валин – 5,0; лейцин – 7,0, изолейцин – 4,0, лизин – 5,5, метионин – 3,5, треонин – 4,0, триптофан – 1,0, фенилаланин – 5,0.

Главными источниками незаменимых аминокислот для человека являются белки животного или растительного происхождения, входящие в состав пищи, а для сельскохозяйственных животных – главным образом растительные белки. Поступающие с пищей или кормом белковые вещества под действием ферментов желудочного сока гидролизуются до аминокислот, которые затем используются для образования белковых молекул человеческого или животного организма. При этом первостепенное значение имеют незаменимые аминокислоты, недостаток которых вызывает прекращение синтеза белков и, следовательно, задержку роста и развития организма.

Следует также учитывать, что все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках пищи в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма. Если хотя бы одна аминокислота окажется в недостатке, то другие аминокислоты, оказавшиеся в избытке, не будут использоваться для синтеза белков (в соответствии с механизмом синтеза белков). В таких условиях для обеспечения дальнейшего синтеза белковых веществ и поддержания жизнедеятельности организма потребуется дополнительное количество пищевого или кормового белка, вследствие чего увеличивается расходование пищи или корма. Последнее особенно важно учитывать в животноводстве, так как несбалансированность кормовых белков по содержанию незаменимых аминокислот приводит к значительному перерасходу кормов и существенному повышению себестоимости животноводческой продукции.

Для предотвращения перерасхода кормов необходимо контролировать, с одной стороны, сбалансированность белков корма по содержанию незаменимых аминокислот, а с другой стороны, количество белка в корме. Для оценки аминокислотного состава белков определяют показатели, характеризующие их биологическую питательную ценность. Кормовые и пищевые белки, имеющие оптимальное содержание незаменимых аминокислот, называют *биологически полноценными белками*.

В результате обобщения многочисленных данных по изучению аминокислотного

состава белков Международной организацией по продовольствию и сельскому хозяйству (ФАО), образованной при ООН, разработаны рекомендации, в которых дается оптимальное содержание незаменимых аминокислот в пищевых и кормовых белках. Эти нормативы используются в качестве эталона при оценке биологической питательной ценности различных белков. Например, если принять за 100 % биологическую ценность эталонного по рекомендациям ФАО белка, то биологическая ценность большинства животных белков составляет 90–95 %; белков вегетативной массы бобовых трав – 80–90 %; белков зерна зернобобовых и семян масличных культур, клубней картофеля, корнеплодов, овощей, вегетативной массы многих травянистых растений – 75–85 %; белков зерна большинства злаковых культур – 60–70 %; особенно низкая биологическая ценность белков зерна кукурузы – 52–58 %.

В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей от 60 до 120 г полноценного белка. Для правильного кормления сельскохозяйственных животных необходимо, чтобы в их кормовом рационе в расчете на каждую кормовую единицу содержалось 100–120 г хорошо перевариваемого и полноценного белка.

Если содержание белков в растительной массе, используемой для кормления сельскохозяйственных животных, ниже, чем требуется по нормам, то во избежание перерасхода кормов и повышения себестоимости животноводческой продукции количество белка в корме балансируют путем добавления белковых концентратов. По такому же принципу контролируют содержание в кормовом белке незаменимых аминокислот. Недостающее до нормы количество какой-либо аминокислоты балансируют добавлением в корм чистых препаратов дефицитных аминокислот или белковой массы, имеющей более высокое содержание данной аминокислоты по сравнению с принятым эталоном.

Характеристика аминокислотного состава различных растительных белков дается в табл. 6.1, из которой видно, что наиболее сбалансированное содержание незаменимых аминокислот имеют белки зерна сои, у нее отмечается лишь некоторый дефицит по метионину и триптофану. Относительно высокую биологическую ценность имеют также белки зерна риса и гороха. В то же время широко возделываемые в нашей стране зерновые культуры – пшеница, кукуруза, ячмень – отличаются несбалансированным аминокислотным составом белков. В белках зерна пшеницы и ячменя очень мало содержится лизина, метионина и изолейцина, а в белках зерна кукурузы еще и триптофана.

Вследствие того, что белки сои хорошо сбалансированы по аминокислотному составу и их содержание в семенах достигает 35–40 %, эта культура имеет важное значение как самый дешевый источник пищевого и кормового белка. Крупнейшим поставщиком соевого белка на мировом рынке являются США. В России, хотя и проводятся работы по расширению посевов сои, ее возделывание ограничено вследствие неблагоприятных климатических условий. Однако ведется поиск других источников полноценного белка. Одним из важных путей в этом направлении является расширение посевов других зернобобовых культур, которые так же, как и соя, способны накапливать в зерне большое количество белка (25–35 %), имеющего

высокую биологическую ценность.

Наряду с этим разрабатываются и реализуются научные программы, связанные с созданием новых генотипов зерновых культур, отличающихся повышенным содержанием в зерне белков с улучшенным аминокислотным составом. Возможность создания таких программ стала реальной после открытия высоколизиновых мутантов кукурузы с генами Опейк-2 и Флаури-2, в белках зерна которых содержится значительно больше лизина и триптофана, чем у обычной кукурузы.

В результате селекционной работы, проведенной в Краснодарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, на основе указанных генов получены высокобелковые и высоколизиновые гибриды кукурузы, которые по урожайности не уступают районированным гибридам. В суммарном белке зерна полученных новых генотипов кукурузы содержание лизина повышено на 50–80 %, триптофана – на 30–50 %. Использование зерна такой кукурузы для кормления сельскохозяйственных животных позволяет существенно повысить их продуктивность и сократить затраты кормового белка на 20–25 %.

Во многих научных лабораториях проводится селекционно-генетическая работа по улучшению аминокислотного состава белков зерна ячменя на основе скрещиваний с высоколизиновыми формами

Хайпроли и Ризо 1508, осуществляется также поиск генетических источников высокого содержания белка с улучшенным аминокислотным составом для пшеницы, тритикале и других зерновых культур. Особые надежды возлагаются на новые методы создания ценных генотипов сельскохозяйственных растений, основанные на использовании достижений генетической и клеточной инженерии.

Зерновые культуры составляют большой удельный вес в структуре кормопроизводства нашей страны. В среднем на долю белков зерна приходится около 50 % от общего количества кормового белка, а в свиноводстве и птицеводстве до 80 %. Для балансирования кормов, включающих в качестве основного компонента зерно злаковых культур, по белку и незаменимым аминокислотам применяются концентрированные кормовые добавки – комбикорма.

Для приготовления комбикормов обычно используют мясо-костную и рыбную муку, отходы мясной и молочной промышленности, жмыхи масличных растений, отруби, шроты зернобобовых культур. Учитывая, что рыбная и костная мука, другие белковые отходы животного происхождения во все большем объеме направляются на получение пищевых белков, требуется их полноценный заменитель, способный сбалансировать недостаток белков и незаменимых аминокислот не только в зерновой части кормового рациона, но и в растительных компонентах комбикормов.

В результате изучения различных организмов было выяснено, что высокой интенсивностью синтеза белков отличаются многие микроорганизмы, причем белки микробных клеток имеют повышенное содержание незаменимых аминокислот. В специальных опытах была проведена пищевая и токсикологическая оценка белковой микробной массы, которая показывает, что клетки некоторых микроорганизмов можно использовать в качестве концентрированных кормовых добавок, не уступающих по биологической ценности белков соевому шроту или рыбной муке.



Микроорганизмы в качестве источников кормового белка имеют ряд преимуществ по сравнению с растительными и даже животными организмами. Они отличаются высоким (до 60 % сухой массы) и устойчивым содержанием белков, тогда как в растениях концентрация белковых веществ значительно варьирует в зависимости от условий выращивания, климата, погоды, типа почвы, агротехники и др. Наряду с белками в микробных клетках образуются и другие ценные в питательном отношении вещества: легкоусвояемые углеводы, липиды с повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот, витамины, макро- и микроэлементы.

При использовании микроорганизмов на ограниченной площади можно организовать промышленное производство и получать большое количество кормовых концентратов в любое время года, причем микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельского хозяйства и промышленности и, таким образом, позволяют одновременно решать другую важную проблему – утилизацию этих отходов в целях охраны окружающей среды.

Микроорганизмы имеют еще одно ценное преимущество – способность очень быстро наращивать белковую массу. Например, растения сои массой 500 кг в фазе созревания семян способны в сутки синтезировать 40 кг белков, бык такой же массы – 0,5–1,5 кг, а дрожжевые клетки массой 500 кг – до 1,5 т белков. В качестве источников кормового белка наиболее часто используются различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, белковые коагуляты травянистых растений.

*Кормовые дрожжи.* Дрожжи впервые стали использовать как источник белка для человека и животных в Германии во время Первой мировой войны, когда была разработана промышленная технология культивирования пивных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), предназначенных для добавления в продукты питания. В нашей стране первый завод по производству кормовых дрожжей был пущен в 1935 г. Дрожжи выращивали на гидролизатах из отходов древесины и другого целлюлозосодержащего растительного сырья, которые при гидролизе образуют легкоусвояемые для микроорганизмов формы углеводов. В настоящее время нашей биотехнологической промышленностью на основе гидролиза растительного сырья производится значительный объем кормовых дрожжей для сельского хозяйства.

В качестве исходного сырья при такой технологии получения кормового белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, льняная костра, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, виноградные выжимки, пивная дробина, верховой малоразложившийся торф, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности.

Измельченное растительное сырье, содержащее большое количество клетчатки, гемицеллюлоз, пентозанов, подвергается кислотному гидролизу при повышенном давлении и температуре, в результате чего 60–65 % содержащихся в них полисахаридов гидролизуются до моносахаридов. Полученный гидролизат отделяют от лигнина, избыток кислоты, применяемой для гидролиза, нейтрализуют известковым молоком или аммиачной водой. После охлаждения и отстаивания в гидролизат добавляют минеральные соли, витамины и другие вещества, необходимые для

жизнедеятельности микроорганизмов. Полученная таким образом питательная среда подается в ферментерный цех, где осуществляется выращивание дрожжей.

Для культивирования на гидролизатах растительных отходов наиболее эффективны дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, которые способны использовать в качестве источника углерода гексозы, пентозы и органические кислоты. При оптимальных условиях из 1 т отходов хвойной древесины можно получить 200 кг кормовых дрожжей.

Для получения кормовых дрожжей применяется технология их глубинного выращивания в специальных аппаратах – ферментерах, в которых обеспечиваются режим постоянного перемешивания суспензии микробных клеток в жидкой питательной среде и оптимальные условия аэрации. В целях поддержания заданного температурного режима в конструкции ферментера предусматривается система отвода избыточной теплоты. Рабочий цикл выращивания культуры дрожжей длится около 20 ч. По окончании рабочего цикла культуральная жидкость вместе с суспендированными в ней клетками дрожжей выводится из ферментера, а в него вновь подается питательный субстрат и культура дрожжевых клеток для выращивания.

Выведенная из ферментера суспензия микробных клеток далее подается на флотационную установку, на которой производится отделение биомассы дрожжей от культуральной жидкости. В процессе флотации происходит вспенивание суспензии, при этом микробные клетки всплывают на поверхность вместе с пеной, которая отделяется от жидкой фазы декантацией. После отстаивания дрожжевая масса концентрируется при помощи сепаратора. Для достижения лучшей перевариваемости дрожжей в организме животных проводится специальная обработка микробных клеток (механическая, ультразвуковая, термическая, ферментативная), обеспечивающая разрушение их клеточных оболочек. Затем дрожжевая масса упаривается до необходимой концентрации и высушивается, влажность готового продукта не должна превышать 8–10 %.

В сухой дрожжевой массе содержится 40–60 % сырого белка, 25–30 % усвояемых углеводов, 3–5 % сырого жира, 6–7 % клетчатки и зольных веществ, большое количество витаминов (до 50 мг%). Посредством обработки дрожжей ультрафиолетовыми лучами проводится их обогащение витамином D<sub>2</sub>, который образуется из содержащегося в них эргостерина. Для улучшения физических свойств готового продукта кормовые дрожжи выпускают в гранулированном виде.

На основе ферментации гидролизатов растительного сырья наряду с производством кормовых дрожжей получают также этиловый спирт. В этом случае особенность технологии заключается в том, что вначале проводится спиртовое брожение, в результате которого происходит утилизация содержащихся в гидролизате гексоз. После отгонки спирта остается неиспользованный субстрат – барда, содержащая в основном пентозы. Эта послеспиртовая барда используется далее как питательная среда для выращивания кормовых дрожжей. Таким образом, из гидролизатов растительных отходов одновременно могут быть получены два вида ценной продукции.

В России и некоторых других нефтедобывающих странах разработаны

технологии получения кормовых дрожжей из *n*-парафинов нефти. Дрожжевые клетки могут использовать в качестве источников углерода для их роста неразветвленные углеводороды с числом углеродных атомов от десяти до тридцати. Они представляют собой жидкие фракции с температурами кипения 200–320 °С, которые выделяют из нефти путем ее перегонки.

Очищенные фракции углеводородов нефти, используемые для выращивания дрожжей, могут быть получены тремя методами: низкотемпературной кристаллизации, карбамидной депарафинизации и адсорбции на молекулярных ситах. В соответствии с первым методом проводится кристаллизация высококипящих фракций после растворения их в смеси органических растворителей при постоянном охлаждении. Затем очищенные путем кристаллизации продукты используются для приготовления питательной среды микроорганизмов. Второй метод основан на способности *n*-парафинов нефти образовывать прочный комплекс с молекулами карбамида, который после отделения от остальных фракций легко разлагается при нагревании, в результате чего при помощи перегонки можно получить очищенную фракцию *n*-парафинов. Третьим методом производится адсорбция нужных фракций углеводородов нефти на молекулярных ситах (цеолитах), после чего проводят их десорбцию, и таким образом удается выделить фракции высокой степени очистки.

В других странах такая технология производства дрожжей не получила развития вследствие высоких мировых цен на нефть. В нашей стране первый завод по производству кормовых дрожжей из жидких парафинов нефти вступил в действие в 1971 г.

При выращивании микроорганизмов на *n*-парафинах нефти в приготовленную из них питательную среду добавляют макро- и микроэлементы, необходимые витамины и аминокислоты, а в качестве источника азота – аммиачную воду. В процессе культивирования дрожжей в ферментере поддерживается оптимальный температурный режим и режим аэрации. Наиболее эффективны для выращивания на *n*-парафинах нефти отселектированные штаммы дрожжей *Candida guilliermondii*. Выделение и сушка дрожжевой массы проводится примерно по такой же технологии, как и в гидролизном производстве. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется как белково-витаминный концентрат (БВК) для кормления сельскохозяйственных животных, содержащий до 50–60 % белковых веществ. Содержание остаточных углеводородов допускается не более 0,1 %.

В целях более полного использования сырья и снижения в товарном продукте остаточных углеводородов разработаны усовершенствованные технологии получения БВК, включающие двухступенчатую ферментацию и последующую экстракцию из дрожжей остаточных углеводородов бензином. При этом содержание сырого белка в дрожжевой массе может быть повышено до 58–65 % в расчете на сухую массу, а содержание остаточных углеводородов снижено до 0,05 %.

Хороший субстрат для выращивания кормовых дрожжей – молочная сыворотка, являющаяся производственным отходом при переработке молока. В 1 т молочной сыворотки в среднем содержится 10 кг полноценного белка и 50 кг дисахарида лактозы, который легко утилизируется микроорганизмами. Для выделения из

молочной сыворотки белков разработана эффективная технология с применением метода ультрафильтрации низкомолекулярных веществ через мембраны. Получаемые таким способом белки используются для приготовления сухого обезжиренного молока или в качестве пищевой белковой добавки. Остающиеся после отделения белков жидкие отходы (пермеат), содержащие лактозу, могут быть затем переработаны путем культивирования дрожжей в обогащенные белками кормовые продукты.

Часто дрожжеванию подвергается молочная сыворотка без предварительного выделения из нее белков, при этом выращиваются специальные расы кормовых дрожжей из рода *Torulopsis*. На основе дрожжевания молочной сыворотки производится три вида кормовых белковых продуктов: заменитель цельного молока для кормления молодняка сельскохозяйственных животных – «БИО – ЗЦМ»; жидкий белковый продукт «Промикс» с содержанием белков в 2,5–3 раза выше, чем в исходной молочной сыворотке; сухой обогащенный дрожжевыми белками продукт «Провилакт», применяемый как заменитель сухого обезжиренного молока.

Кроме углеводов и углеводородов в качестве источников углерода дрожжевые клетки могут также использовать низшие спирты – метанол и этанол, которые обычно получают из природного газа или растительных отходов. Дрожжевая масса, полученная после культивирования дрожжей на спиртах, отличается высоким содержанием белков (56–62 % от сухой массы) и в ней меньше содержится вредных примесей, чем в кормовых дрожжах, выращенных на *n*-парафинах нефти.

Как показывают опыты по изучению питательных свойств кормовых дрожжей, они достаточно хорошо перевариваются в организме животных (переваримость белков 80–90 %), по сумме незаменимых аминокислот близки к эталону ФАО, а по содержанию в белках лизина, треонина, валина и лейцина существенно превышают эталон ФАО. Вместе с тем белки дрожжей частично не сбалансированы по метионину и в них содержится мало других серосодержащих аминокислот.

По сравнению с растительными источниками белков кормовые дрожжи имеют повышенное содержание нуклеиновых кислот (4–6 % от сухой массы), которые в такой концентрации оказывают вредное воздействие на организм. В результате их гидролиза образуется много пуриновых оснований, превращающихся затем в соли мочевой кислоты, которые откладываясь в организме, могут быть причиной мочекаменной болезни, остеохондроза и других заболеваний. Вследствие этого оптимальная норма добавления дрожжевой массы в корм сельскохозяйственных животных обычно составляет не более 5–10 % от сухого вещества или 10–20 % дрожжевого белка от общего количества белка в кормовом рационе.

Кормовые дрожжи, культивируемые на питательной среде из *n*-парафинов нефти, могут содержать многие вредные примеси — производные бензола, *D*-аминокислоты, аномальные липиды, различные токсины и канцерогенные вещества, поэтому их подвергают специальной очистке (экстракция бензином).

При организации производства кормовых дрожжей во избежание загрязнения окружающей среды возникают проблемы очистки газообразных и жидких отходов, в связи с чем ведется работа по созданию экологически чистых безотходных технологий с замкнутым циклом водоиспользования.

Кроме совершенствования производственной технологии, важное значение имеет создание высокопродуктивных штаммов дрожжей, способных накапливать много белка, быстро наращивать биомассу и эффективно использовать субстрат для своей жизнедеятельности. Для создания новых штаммов микроорганизмов применяются как методы обычной селекции, так и генно-инженерная биотехнология.

Наряду с использованием дрожжевых белков в качестве кормовой добавки при балансировании рационов сельскохозяйственных животных ставится задача сделать эти белки пригодными для питания человека. Уже в 30-х – 40-х годах XX века в некоторых странах были разработаны технологии культивирования пивных и других пищевых дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea*, *Candida utilis*), которые использовались как белковые добавки к различным пищевым продуктам.

При переработке в пищевой белок биомассу дрожжей тщательно очищают. С этой целью клеточные оболочки дрожжевых клеток разрушают при помощи механической, щелочной, кислотной или ферментативной обработки и затем экстрагируют гомогенную дрожжевую массу органическим растворителем. После очистки от органических и минеральных примесей полученный дрожжевой продукт обрабатывают щелочным раствором для растворения белков, затем белковый раствор отделяют от оставшейся массы дрожжей и направляют на диализ. В процессе диализа из белкового раствора удаляются низкомолекулярные примеси. Очищенные диализом белки осаждают, высушивают и полученную белковую массу используют в качестве добавок в различные пищевые продукты: сосиски, студни, паштеты, мясные и кондитерские начинки.

Белки дрожжей находят также применение при получении искусственного мяса, для этого проводится текстурирование белков — нагревание с последующим быстрым охлаждением или продавливание белковой пасты через отверстия малого диаметра. Для улучшения свойств в белковую пасту добавляют полисахариды и другие компоненты. Гидролизаты белков используются в качестве вкусовых приправ, для приготовления медицинских препаратов и лечебного питания.

*Белковые концентраты из бактерий.* Наряду с получением кормовых дрожжей важное значение для кормопроизводства имеют также бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60–80 % от сухой массы. Известно более 30 видов бактерий, которые могут быть использованы в качестве источников полноценного кормового белка. Бактерии способны наращивать биомассу в несколько раз быстрее дрожжевых клеток и в белке бактерий содержится значительно больше серосодержащих аминокислот, вследствие чего он имеет более высокую биологическую ценность по сравнению с белком дрожжей. Источником углерода для бактерий могут служить различные газообразные продукты (природный и попутный газы, газовый конденсат и др.), низшие спирты (метанол и этанол), водород.

При использовании в качестве сырья газообразных продуктов, основным компонентом которых является метан, питательную смесь под давлением подают в специальный ферментер струйного типа. В целях лучшей утилизации сырья микроорганизмами в таком ферментере предусматривается рециркуляция газовой смеси. Для обеспечения необходимой аэрации культуры бактерий производится

продувка ферментера воздухом или кислородом. Чаще всего на газовых питательных средах выращивают бактерии рода *Methylococcus*, способные при оптимальных условиях утилизировать до 85–90 % подаваемого в ферментер метана. Все технологические линии, связанные с культивированием бактерий в газовой среде, требуют точного контроля за составом этой среды и оснащения производственных установок герметизированным, взрывобезопасным оборудованием.

По окончании ферментации клетки бактерий осаждают и отделяют от питательной среды на сепараторе. Полученную бактериальную массу затем подвергают механической или ультразвуковой обработке с целью разрушения клеточных оболочек, после чего высушивают и используют для приготовления кормовых белковых концентратов.

В связи с тем, что газовая среда из метана и воздуха взрывоопасна и для лучшей утилизации метана бактериями требует постоянной рециркуляции, производство кормового белка из газообразных продуктов является довольно сложным и дорогим. Более широкое применение находит технология выращивания бактериальной белковой массы на метаноле, который можно легко получить путем окисления метана. При культивировании на питательной среде, содержащей метанол, наиболее эффективны бактерии родов *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Methylophilus*. Выращивают эти бактерии в обычном ферментере с использованием жидкой питательной среды.

Широкомасштабное производство кормовых белков на основе использования метанола впервые было организовано в Англии. Концерном «Ай-Си-Ай» выпускается кормовой белковый препарат с коммерческим названием «Прутин». В нашей стране также разработана технология получения бактериальной белковой массы из метанола, коммерческое название препарата – «Меприн». Он содержит в своем составе до 70–74 % от сухой массы белков, до 5 % липидов, животных. Для лучшей их переваримости разрушают целлюлозные оболочки посредством специальной обработки.

Клетки спирулины в 100 раз крупнее хлореллы, однако, они не имеют прочной целлюлозной оболочки и поэтому лучше перевариваются в организме животных. Выращивается спирулина в щелочной среде (рН 10–11), при естественных условиях в щелочных озерах.

По интенсивности накопления биомассы водоросли, хотя и уступают кормовым дрожжам и бактериям, значительно превосходят сельскохозяйственные растения. При их выращивании в культиваторах открытого типа с 1 га водной поверхности можно получать до 70 т сухой биомассы в год, тогда как при возделывании пшеницы – 3–4 т, риса – 5 т, сои – 6 т, кукурузы – 7 т.

Содержание белков в клетках хлореллы и сценедесмус составляет 45–55 % в расчете на сухую массу, а в клетках спирулины достигает 60–65 %. Белки водорослей хорошо сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот, недостаточно содержится лишь метионина. Наряду с высоким содержанием белковых веществ в клетках водорослей довольно много синтезируется полиненасыщенных жирных кислот (являющихся, как и некоторые аминокислоты, незаменимыми) и провитамина А – каротина (до 150 мг%). Каротин в биомассе

водорослей в 7–9 раз больше, чем в травяной муке из люцерны, отличающейся наиболее высоким содержанием этого провитамина среди кормовых трав. Содержание нуклеиновых кислот в одноклеточных водорослях значительно ниже (2–4 %), чем у бактерий, однако несколько выше по сравнению с растительными источниками белка (1–2%).

Технология получения белковой массы из клеток водорослей включает выращивание промышленной культуры в культиваторах открытого или закрытого типа, отделение водорослей от массы воды, приготовление товарного продукта в виде суспензии, сухого порошка или пастообразной массы. Процесс отделения клеток водорослей от массы воды энергоемкий, так как необходимо перерабатывать большие объемы жидкости.

Вначале отстаивают клеточную суспензию, затем клетки водорослей отделяют от воды декантацией. Для ускорения осаждения клеток часто применяют метод химической флокуляции, вызывающий быструю коагуляцию частиц. После осаждения клеточной биомассы ее пропускают через сепаратор, в результате чего происходит концентрирование суспензии до необходимой концентрации. Если требуется получить пастообразный препарат, то полученную белковую массу высушивают. Для улучшения переваримости биомассы клеток хлореллы и сценедесмус проводят их обработку с целью разрушения клеточных оболочек.

В нашей стране наиболее распространено выращивание хлореллы, которая применяется для кормления сельскохозяйственных животных в виде суспензии (1,5 г/л сухого вещества) или сухого порошка. Суточная норма суспензии хлореллы при кормлении молодняка крупного рогатого скота – 3–6 л, взрослых животных – 8–10 л. При добавлении в корм жвачных животных муки хлореллы допускается замена 50 % растительного белка белком водоросли.

Важное значение имеет выращивание водорослей на стоках промышленных предприятий, тепловых электростанций, животноводческих комплексов, так как в этих случаях наряду с получением кормового белка одновременно решаются проблемы, связанные с защитой окружающей среды. Так, например, выращивание культуры сценедесмус или хлореллы на стоках животноводческих комплексов в течение 15 сут позволяет почти полностью очистить их от органических веществ, исчезает запах и цвет. При культивировании водорослей на промышленных стоках или стоках тепловых станций используется отводимый с этих объектов избыток теплоты, а также утилизируется углекислота, образуемая как побочный продукт технологических процессов и в результате сжигания различных отходов.

Культиваторы открытого типа для выращивания водорослей имеются во многих странах. Крупнейшая фирма по выращиванию хлореллы «Хлорелла Сан Компани» имеется в Японии. В Болгарии на водах термальных источников культивируют водоросли хлорелла и сценедесмус, причем болгарским ученым удалось получить штаммы хлореллы без целлюлозной оболочки, вследствие чего биомасса таких клеток хорошо переваривается в организме животных. В значительном количестве белковые концентраты из водоросли спирулины производятся в странах центральной Африки и Мексике, где имеются щелочные озера. Крупнейшим производителем различной продукции из биомассы и белков спирулины является

фирма «Соса Текскоко» (Мексика). В Италии разрабатывается технология выращивания клеток спирулины на морской воде и в культиваторах закрытого типа.

В связи с тем, что биомасса водорослей рода *Spirulina* легко переваривается ферментами желудочного сока и характеризуется высоким содержанием белков (до 70 % сухой массы), хорошо сбалансированных по аминокислотному составу, она в ряде стран используется для приготовления продуктов питания, главным образом кондитерских изделий, обогащенных белком.

Учитывая важное значение вводимых в промышленную культуру водорослей как дополнительного источника полноценного белка для кормления сельскохозяйственных животных и питания людей, учеными разных направлений — селекционерами, генетиками, биохимиками — проводятся исследования по улучшению существующих промышленных штаммов одноклеточных водорослей и получению новых генотипов, которые должны сочетать в себе высокую интенсивность фотосинтеза, холодоустойчивость, хорошую переваримость, способность синтезировать большое количество белка лучшего качества (повышенное содержание незаменимых аминокислот) и полнее утилизировать субстрат. Важная роль в реализации таких исследований отводится методам генетической инженерии.

*Белки микроскопических грибов.* Ценным источником хорошо сбалансированных по аминокислотному составу белков являются клетки мицелия многих микроскопических грибов. По своим питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса, вследствие чего могут использоваться не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавка в пищу человека. Сырьем для промышленного выращивания микроскопических грибов обычно служат растительные отходы, содержащие клетчатку, гемицеллюлозы, лигнин. При этом одновременно решаются две важные задачи — получение белковой массы и утилизация отходов растениеводства, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, которые могут быть источниками загрязнения окружающей среды.

Особенно важно найти активные штаммы микроорганизмов, способные утилизировать углерод лигнина, обладающего высокой устойчивостью к разложению микрофлорой. В природе лигнин разлагается лишь грибами коричневой и белой гнили из родов *Stropharia*, *Pleurotus*, *Abortiporus*, *Coriolus*, *Stereum* и др. В настоящее время в процессе исследований отобраны атоксичные быстрорастущие штаммы мезо- и термофильных грибов для промышленного культивирования из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*. Клетки мицелия этих грибов имеют тонкую клеточную оболочку, вследствие чего очень хорошо перевариваются в желудочно-кишечном тракте животных. Они содержат в своем составе комплекс ароматических веществ, улучшающих их вкусовые качества, богаты витаминами и легкоусвояемыми липидами. По сравнению с дрожжевыми белки микроскопических грибов отличаются повышенным содержанием серосодержащих аминокислот и лучшей усвояемостью. Концентрация нуклеиновых кислот в грибном мицелии (1–4 % от сухой массы) почти такая же, как в тканях растительного организма. Вместе с тем в биомассе грибов значительно меньше, чем в дрожжах, синтезируется белков (20–60 % от сухой массы) и у них относительно медленней происходит рост



биомассы (удвоение биомассы через 4–16 ч, тогда как у дрожжей через 2–3 ч).

Низшие мицелиальные грибы, культивируемые на целлюлозо- и лигнинсодержащих растительных отходах, вследствие их способности синтезировать комплекс гидролитических ферментов разлагают целлюлозу и лигнин до простых веществ, из которых образуются аминокислоты и белки. В целях ускорения роста грибов проводится предварительная обработка растительного сырья, повышающая доступность его компонентов для утилизации микроорганизмами. Чаще всего применяют кислотно-щелочной способ обработки целлюлозо- и лигнинсодержащих отходов, отпаривание под давлением, обработку аммиаком и каустической содой. После такой обработки происходит полное или частичное разложение трудногидролизуемых полисахаридов и лигнина, что обеспечивает ускоренный рост грибной массы и сокращает сроки промышленного культивирования грибов (до 7-8 сут).

В зависимости от способа подготовки растительного сырья для культивирования микроскопических грибов применяют и соответствующие технологии их выращивания. Для культивирования грибов на твердой питательной среде разработан метод твердофазной ферментации, который включает измельчение и обработку растительного сырья парами воды и аммиака, обогащение этого сырья минеральными веществами, посев и выращивание мицелия грибов в заданном режиме аэрации и поддержания оптимальной температуры. Однако при такой технологии культивирования грибов коэффициент использования растительного сырья невысокий, что предопределяет и сравнительно невысокий уровень содержания белка в выращиваемой грибной массе (20–30 % от сухой массы). Так, прямое культивирование низших мицелиальных грибов на соломе и других отходах растениеводства обеспечивает включение углерода из этих источников в органическое вещество грибного мицелия на 17–25 %.

Более высокий коэффициент использования сырья обычно достигается при выращивании грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, для этих целей применяют метод глубинного культивирования, как и при выращивании кормовых дрожжей. Содержание белков в грибной массе, выращенной на жидкой питательной среде, может достигать 50–60 % от сухой массы. В целях более полного использования также практикуется совместное культивирование грибов и бактерий. Наряду с использованием растительных отходов разработаны технологии по переработке в грибной белок торфа, навоза, экскриментов животных.

Хорошая перевариваемость грибной белковой массы в организме животных, а также низкий уровень содержания нуклеиновых кислот позволяют использовать ее в качестве кормовой добавки в значительно большей концентрации, чем кормовые дрожжи. Обычно при кормлении молодняка животных допускается введение в кормовые рационы грибного белка в пределах 15–20 % от белка корма, а при кормлении взрослых животных возможна замена в корме 50 % растительного белка на грибной.

*Кормовые белковые концентраты из растений.* В поисках источников полноценного кормового и пищевого белка ученые уже давно обратили внимание,

что дикие травоядные животные, для которых единственным источником белка являются пастбищные травянистые растения, нормально развиваются и не имеют каких-либо отклонений в обмене веществ, связанных с недостатком незаменимых аминокислот. Все это свидетельствует о том, что белки вегетативной массы трав и других растений имеют хорошо сбалансированный аминокислотный состав. Они различаются в основном по интенсивности синтеза белков, тогда как аминокислотный состав их белков довольно близок по содержанию всех аминокислот белки трав не уступают или значительно превышают эталон ФАО, и только лишь некоторый дефицит отмечается по количеству метионина.

Опыты показывают, что из всех травянистых растений наиболее высокую биологическую ценность белков имеют бобовые кормовые травы (80–90 %), несколько ниже биологическая ценность белков у мятликовых трав (75–85 %). Бобовые растения также отличаются более высоким содержанием белков в вегетативной массе (15–25 % от сухой массы), чем мятликовые травы (8–15 %). Особенно много белков содержится в листьях люцерны.

Благоприятный аминокислотный состав белков вегетативной массы трав и способность многих из них к интенсивному синтезу в листьях белковых веществ послужили реальной основой для разработки технологии извлечения из растительной массы белков с целью их использования на кормовые и пищевые нужды. Первые такие опыты относятся к 1773 г. Белки в этих опытах выделяли из растений путем отжатия сока.

Однако позднее было выяснено, что в растительном соке содержится много вредных примесей, таких как фенолы, тяжелые металлы, ингибиторы трипсина (фермент желудочного сока животных и человека), гемолизирующие вещества (свертывающие кровь), нуклеиновые кислоты, алкалоиды, продукты разложения хлорофилла и др. Больше таких веществ — в ядре, хлоропластах, митохондриях и меньше — в цитоплазме. Исходя из этого, для использования на кормовые и пищевые цели наиболее пригодны цитоплазматические белки.

В нашей стране промышленное производство белков из растительных соков впервые было организовано в 1942 г., выпускался белковый концентрат, содержащий в значительном количестве провитамин А-каротин, он использовался для лечения раненых. К началу 1960-х годов были разработаны технологии получения растительного белка для пищевых целей и использования в животноводстве.

Небольшие промышленные установки для получения кормовых белковых концентратов из вегетативной массы растений могут размещаться на территории любого хозяйства, имеющего собственный кормоцех. Технология приготовления белковых концентратов включает измельчение растительной массы, отжим сока, коагуляцию сока, разделение коагулята на зеленую творогообразную массу и коричневый сок, консервирование белково-витаминной пасты. Технологическая схема работы одной из таких установок показана на рис. 6.3.

Таким образом, в результате переработки растительной массы могут быть получены три вида кормов: белковый коагулят, из которого получают белково-витаминную пасту; ферментированный сок, образующийся после отделения белкового коагулята; остатки растительного материала после отжатия сока в виде

жома.

*Белковый коагулят*, содержащий 15–22 % белков на сухую массу, обычно скармливают животным в зимний период. При пониженной температуре он может храниться без добавления консервантов в течение месяца. При скармливании жвачным животным белково-витаминной пасты ее белок может составлять до 50 % от белка кормового рациона.

*Ферментированный коричневый сок* содержит 7–12 % сухого вещества, 1–3 % белков, 1 – 1,5 % органических кислот, 4 –5 % безазотистых экстрактивных веществ (сумма легкоусвояемых углеводов), 1–2 % зольных веществ, 40–50 мг% каротина. Он используется для добавления в корм сельскохозяйственным животным (свиньям, например, 1,5 л на голову в сутки). Кроме того, коричневый сок можно перерабатывать в кормовые дрожжи.

*Жом* также может быть использован для кормления животных, в его сухом веществе содержится 12–17 % белков, 3–4 % сырого жира, 8–9 % зольных веществ, 35 % сырой клетчатки.

Обычно для получения белково-витаминной пасты используют листья люцерны, клевера, сахарной свеклы. Белковую массу из листьев сахарной свеклы при соответствующей очистке можно также перерабатывать в пищевой белок.

### ***Производство незаменимых аминокислот и кормовых витаминов.***

Получение кормовых белковых концентратов с повышенным содержанием незаменимых аминокислот позволяет балансировать корма сельскохозяйственных животных главным образом по уровню белка, тогда как оптимальный аминокислотный состав кормового белка при таком способе балансирования полностью не достигается.

По некоторым аминокислотам почти всегда требуется для доведения их концентрации в кормовом рационе до оптимума добавление препаратов чистых аминокислот, полученных промышленным способом. В мире ежегодно производится не менее 300 тыс. т кормовых препаратов незаменимых аминокислот. Расширяется их производство и в нашей стране.

Возможны три способа промышленного получения незаменимых аминокислот: гидролиз белков растительного и микробного происхождения, микробиологический, а также химический синтез. Более 60 % всех производимых промышленностью чистых препаратов аминокислот получают путем микробиологического синтеза. На втором месте по объему производства находится химический синтез. Основным недостатком химического синтеза является получение смеси аминокислот, состоящей из изомеров, относящихся как к D-, так и к L-ряду, тогда как биологической активностью в организме человека и животных обладают лишь L-формы. D-Формы аминокислот не перевариваются ферментными системами этих организмов, а некоторые из них токсичны для человека и животных. Исключением в этом отношении является аминокислота метионин, у которой биологически активны как D-, так и L-формы, в связи с чем данная аминокислота производится преимущественно методом химического синтеза. Технологически получение

аминокислот за счет гидролиза белков экономически менее выгодно, поэтому не получило широкого распространения.

Путем микробиологического синтеза образуются L-аминокислоты, являющиеся продуктами жизнедеятельности специально подобранных и отселектированных штаммов микроорганизмов, которые способны накапливать в культуральной жидкости до 150 г/л синтезируемой аминокислоты. Чаще всего для микробиологического синтеза аминокислот используются ауксотрофные мутантные штаммы, которые получают методами обычной селекции или генной инженерии. С помощью мутагенных факторов у таких ауксотрофных штаммов индуцируется мутация, в результате которой прекращается или ингибируется синтез одного из продуктов, оказывающих регуляторное воздействие на ферментные системы, катализирующие образование данной аминокислоты, в результате чего концентрация этой аминокислоты в клетках мутанта и в культуральной жидкости повышается.

На основе культивирования микроорганизмов с целью получения чистых препаратов аминокислот применяются промышленные технологии, включающие одно- и двухступенчатый синтез аминокислот. При одноступенчатом синтезе в промышленных культиваторах выращивают ауксотрофные мутанты, являющиеся сверхпродуцентами тех или иных аминокислот. После завершения рабочего цикла их выращивания производится отделение культуральной жидкости от клеток микроорганизмов, сгущение культуральной жидкости и получение из нее товарного продукта с высокой концентрацией синтезированной микробами аминокислоты в процессе двухступенчатого синтеза аминокислоты вначале получают ее предшественника (часто наиболее дешевым химическим синтезом), а затем с помощью ферментов, вырабатываемых микроорганизмами, производится превращение предшественника в аминокислоту, при этом образуется только L-форма. В качестве источника фермента могут быть использованы либо суспензия клеток микроорганизмов, либо полученный после разрушения этих клеток ферментный раствор.

*Микробиологический синтез лизина.* Процесс синтеза всех указанных аминокислот (лизина, треонина, метионина и изолейцина) начинается фосфорилированием аспарагиновой кислоты с участием фермента аспартаткиназы, активность которого ингибируется совместным действием двух аминокислот — лизина и треонина, если они накапливаются в клетках бактерий в избыточной концентрации. Если каким-либо путем понизить концентрацию одной из этих аминокислот, то синтез другой будет осуществляться даже при условии, когда она накапливается в довольно высокой концентрации.

В соответствии со схемой превращения аминокислот для снятия регуляции синтеза лизина необходимо прекратить образование треонина на стадии превращения полуальдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин, катализируемого ферментом гомосериндегидрогеназой. Последнее достигается посредством мутагенеза. Опыты показывают, что мутантные клетки, не образующие гомосериндегидрогеназы, при их культивировании на искусственной питательной среде обеспечивают высокий выход лизина. Дефицитные аминокислоты, которые не синтезируются мутантными клетками (гомосерин, треонин, метионин), вводятся в

состав питательной среды в таком количестве, чтобы они не были регуляторами синтеза лизина.

В процессе приготовления питательной среды для культивирования производственных штаммов ауксотрофных мутантов, обладающих способностью к сверхсинтезу аминокислоты лизина, в качестве источника углерода обычно используют смеси, включающие уксусную кислоту и свекловичную мелассу, в качестве источника азота — соли аммония, мочевины, кукурузный экстракт, гидролизаты дрожжей. Кроме дефицитных аминокислот, которые не синтезируются клетками мутантов, в питательную среду также добавляют необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов макро- и микроэлементы (P, Mg, Fe, Ca, Mn и др.) и витамины (витамины группы B, биотин и др.). В процессе культивирования микроорганизмов обеспечивается подача стерильного воздуха при помощи специальных турбинных мешалок, для предотвращения вспенивания субстрата и клеточной суспензии в среду культивирования добавляется пеногаситель.

Посевной материал, предназначенный для производственной ферментации, вначале выращивают в посевных аппаратах при 28—32 °С, pH 7–7,2 в течение 18–24 ч, а затем полученная суспензия клеток подается в производственные ферментеры емкостью 50—100 м<sup>3</sup>, в которых поддерживается постоянный режим аэрации, необходимое давление, осуществляется контроль за всеми компонентами и параметрами среды. Время ферментации 55–72 ч. Накопление в культуральной жидкости лизина начинается после 25–30 ч выращивания промышленной культуры и к концу ферментации достигает 40–50 г/л. Культуральную жидкость отделяют от культуры клеток продуцента фильтрованием и используют для получения препаратов лизина.

На основе промышленной культуры синтезирующих лизин бактерий организовано производство нескольких видов товарной продукции: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ), высококонцентрированные кормовые и высокоочищенные кристаллические препараты для пищевой и медицинской промышленности.

Жидкий концентрат лизина получают путем упаривания культуральной жидкости на вакуумной установке до концентрации сухого вещества 40 %. Для предотвращения дегградации лизина в процессе нагревания в культуральную жидкость добавляют бисульфит натрия и соляную кислоту до pH 4,5—5,0, в результате чего образуется соль — монохлоргидрат лизина.

В процессе получения сухого кормового концентрата лизина ЖКЛ высушивают горячим воздухом на распылительной сушилке при температуре 90 °С до влажности препарата 4—8 %. Высушенный таким образом препарат содержит 15—20 % монохлоргидрата лизина, 15—17 % белков, 14 % других аминокислот, витамины группы B, минеральные вещества. В целях снижения гигроскопичности препарата в него добавляют наполнители: костную муку, негашеную известь, бентонит, пшеничные отруби. Чаще всего в качестве наполнителя используют отруби, которые добавляются в ЖКЛ после упаривания. Полученную в результате тщательного перемешивания пасту высушивают на вальцово-ленточной сушилке и гранулируют. Гранулированный препарат ККЛ негигроскопичен, содержит 7—10 % лизина.

Для получения очищенного высококонцентрированного препарата лизина

культуральную жидкость после фильтрования подкисляют соляной кислотой до pH 1,6—2,0. Образовавшийся в результате взаимодействия с соляной кислотой раствор монохлоргидрата лизина направляется на колонки с катионитом, где происходит сорбция аминокислоты и отделение ее от культуральной жидкости. Затем прогодится десорбция аминокислоты путем элюирования 0,5—5 %-м раствором аммиака. Элюат упаривается под вакуумом при 60 °С до концентрации сухого вещества 30—50 %, после чего подкисленный соляной кислотой раствор монохлоргидрата высушивается и используется как кормовой концентрат. Путем перекристаллизации полученной соли можно получить препараты лизина с содержанием монохлоргидрата 97—98 %.

В процессе производства лизина кроме основного продукта полезное применение находят также побочные продукты и отходы. Так, после отделения культуральной жидкости в осадке остаются клетки бактерий-продуцентов, фосфаты и другие компоненты питательной среды, которые после их высушивания могут быть использованы в качестве кормовой белковой добавки. С другой стороны, технологические стоки и промывные воды после выделения монохлоргидрата лизина, содержащие в растворенном состоянии аминокислоты, другие ценные компоненты культуральной жидкости, остаточный лизин, объединяют и полученную смесь упаривают, а затем высушивают с наполнителем до влажности 10 %, в результате получают кормовой препарат с высоким содержанием белков (до 40 %) и незаменимых аминокислот.

В ряде стран (Япония, США) для получения лизина применяется химико-энзиматический метод, позволяющий создать высокоэффективные технологии, сочетающие достоинства химического и микробиологического синтеза.

В результате химического синтеза образуется рацемическая смесь D- и L-капролактама. Эта смесь направляется в реактор с ферментом гидролазой α-амино-ε-капролактама, который катализирует превращение L-капролактама в L-лизин. D-Изомер капролактама далее подвергается превращению в L-форму с участием специфической рацемазы. При такой технологии получения лизина его содержание в реакционной смеси по завершении рабочего цикла достигает свыше 150 г/л.

Продуцентами гидролазы α-амино-ε-капролактама служат некоторые штаммы дрожжей из родов *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*. Дрожжи выращиваются в щелочной среде на оптимизированной для синтеза фермента питательной среде, содержащей активаторы  $Mn^{2+}$ ,  $Mg$   $Zn^{2+}$ . Для ферментативной реакции превращения капролактама в лизин может использоваться клеточная суспензия дрожжевых клеток с активным ферментом, клеточный экстракт (после разрушения и отделения клеток) или очищенный фермент. Рацемазу, катализирующую превращение D-капролактама в L-изомер, получают из бактерий *Achromobacter*, *Flavobacterium* и др.

Процессы изомеризации D-капролактама в L-изомер и превращение L-капролактама в лизин можно проводить одновременно. Для этого в водный раствор D-, L-капролактама вводится необходимое количество дрожжевых и бактериальных клеток, задаются оптимальные режимы температуры, pH, аэрации. На выходе из реактора образуется преимущественно один продукт — L-лизин, который выделяют из смеси и далее очищают и сушат. Кроме изложенной выше технологии получения чистых препаратов лизина разрабатываются и другие методы, сочетающие в себе

использование химического синтеза для получения предшественников лизина и энзиматическое превращение их в лизин на конечной стадии производства, что позволяет значительно интенсифицировать производственный процесс и снизить себестоимость продукции.

*Микробиологический синтез триптофана.* Наряду с лизином разработаны промышленные технологии получения кормовых и высокоочищенных препаратов другой незаменимой аминокислоты — триптофана. Для производства этой аминокислоты применяется как одноступенчатый синтез при помощи бактериальных ауксотрофных мутантов с нарушенной регуляцией, так и двухступенчатый синтез, включающий вначале получение предшественника триптофана, а затем его ферментативное превращение в конечный продукт — триптофан.

У бактерий и многих других организмов аминокислота триптофан образуется из эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпировиноградной кислоты через ряд последовательных реакций, включающих образование шикимовой и хоризмовой кислот, а непосредственным предшественником триптофана в процессе его синтеза является антраниловая кислота.

Синтез указанных в схеме аминокислот ингибируется конечными продуктами, которые действуют на ферменты, катализирующие начальные этапы превращений, связанные с образованием хоризмовой кислоты. Из схемы 2 видно, что для смещения метаболических реакций по пути преимущественного образования триптофана необходимо блокировать превращение хоризмовой кислоты в префеновую. Такое блокирование достигается действием мутагенных факторов. У мутантов с пониженной активностью ферментов, катализирующих превращение хоризмовой кислоты в префеновую, наблюдается повышенный синтез аминокислоты триптофана, однако для нормального развития этих мутантов в питательную среду необходимо добавлять дефицитные аминокислоты — фенилаланин и тирозин в количествах, не вызывающих регуляторное ингибирование ферментов синтеза триптофана.

Для промышленного получения незаменимой аминокислоты триптофана разработаны технологии на основе использования ауксотрофных мутантов бактерии *Bacillus subtilis* с нарушенным синтезом фенилаланина и тирозина. Все технологические процессы организованы примерно по такой же схеме, как и получение лизина при помощи мутантов коринебактерий. Ферментация длится 48 ч при 37 °С, концентрация триптофана в культуральной жидкости достигает 10 г/л. После отделения культуральной жидкости от клеток бактерий она упаривается и высушивается при 110–120 °С. Высушенный продукт называют кормовым концентратом триптофана (ККТ).

При получении высококонцентрированных препаратов триптофана культуральную жидкость подвергают дополнительной очистке. Вначале ее подкисляют соляной кислотой до рН 1,0, затем центрифугированием отделяют образовавшийся осадок. Далее центрифуга содержащий триптофан, пропускают через ионно-обменные с катионитом, в результате чего происходит связывание аминокислоты катионитом и выделение ее из культуральной жидкости. После

промывки колонок производится десорбция триптофан 5 %-м раствором аммиака в смеси изопропанола и воды. Элюат направляется в вакуумный выпариватель, после чего проводится кристаллизация аминокислоты при 4—8 °С. Выделенная в кристаллическом виде соль триптофана промывается этанолом и высушивается под вакуумом при 60 °С. Высушенный кристаллический препарат<sup>^</sup> держит не менее 99 % триптофана в виде хлорида. Осадок после отделения культуральной жидкости, содержащий клетки культуры бактерий, также высушивают и используют как высокобелковую кормовую добавку, содержащую, кроме того, повышенное количество триптофана.

В нашей стране синтез триптофана производится по двухступенчатой схеме. Вначале методом химического синтеза получают предшественник триптофана — антраниловую кислоту, которую затем с участием ферментов микробного происхождения превращают в триптофан. Биохимическое превращение антраниловой кислоты в<sup>^</sup> триптофан проходит в три этапа:

На первом этапе из антраниловой кислоты с участием фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) образуется аминокликозид-1М-(5'-фосфорибозил)-антраниловая кислота, которая далее в результате внутримолекулярной перегруппировки и декарбокислирования превращается в индол-3-глицерофосфат. На последнем этапе под действием фермента триптофансинтетазы из индолглицерофосфата и аминокислоты серина осуществляется синтез триптофана. В связи с тем что в качестве активной группы у фермента триптофансинтетазы служит пиридоксальфосфат, от наличия в среде этого кофермента зависит скорость превращения антраниловой кислоты в триптофан. В качестве источника ферментов для указанных реакций используют дрожжи *C. utilis*.

Производственный процесс биохимического превращения антраниловой кислоты в триптофан проводится в две стадии. На первой стадии наращивается биомасса дрожжей, являющихся продуцентами ферментов. Питательная среда для выращивания дрожжей готовится из свекловичной мелассы, мочевины и минеральных солей. Ферментация продолжается в течение 24 ч при 30 °С. Далее в ферментер начинают вводить спиртовой 5 %-й раствор антраниловой кислоты и 50 %-й раствор мочевины. Через 3—4 ч после добавления антраниловой кислоты в ферментер дополнительно подается углеродный субстрат — меласса в виде 25 %-го раствора. На последующих этапах ферментации периодически производится подача антраниловой кислоты и мочевины через каждые 6 ч и раствора мелассы — через каждые 12 ч. Длительность ферментации около 120 ч, а с учетом времени наращивания биомассы дрожжей — 144 ч. Содержание триптофана в культуральной среде составляет 0,3—0,5 %, или примерно 6 г/л. После упаривания и сушки получают кормовой концентрат триптофана (ККТ), содержащий 90 % сухого вещества, 48—54 % белков, 1—3 % триптофана, 1,5-4,9 мг% витамина В<sub>2</sub> 2,5—3,3 мг% витамина В<sub>2</sub>, 62—68 мг% витамина Р.

### **Производство кормовых витаминных препаратов.**

Важным фактором повышения питательной ценности кормов сельскохозяйственных животных является наличие в них витаминов —



биологически активных веществ разного химического строения, необходимых для поддержания жизнедеятельности организмов. Биологическая активность витаминов определяется тем, что они в качестве активных группировок входят в состав каталитических центров ферментов. Поэтому при недостатке этих веществ понижается активность соответствующих ферментов и, как следствие, ослабляются или полностью прекращаются биохимические процессы, происходящие с участием данных ферментов. Последнее является причиной ряда серьезных заболеваний, вызванных недостатком витаминов.

Как установлено, организмы человека и животных не способны синтезу витаминов, тогда как растения при нормальных условиях развития полностью обеспечивают себя необходимыми витаминами (за исключением витамина В12). Микроорганизмы также синтезируют большинство необходимых им витаминов. Исходя из этого видно, что продукты растительного и микробного происхождения представляют собой незаменимые источники витаминов как для животных, так и для человека.

Удовлетворение потребности этих организмов в витаминах осуществляется двумя путями — поступление с пищей и синтез микрофлорой желудочно-кишечного тракта. Для организмов с однокамерным желудком, имеющим значительно меньше микрофлоры, главный путь обеспечения витаминами — потребление с пищей или непосредственно витаминов, или их метаболитических предшественников провитаминов, которые в организме человека и животных превращаются в витамины. В то же время жвачные животные, имеющие в прежелудках обильную микрофлору, способную к синтезу витаминов, значительной степени удовлетворяют свою потребность во многих витаминах за счет переваривания клеток отмерших микроорганизмов.

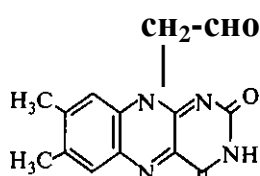
Как установлено, организмы человека и животных не способны синтезу витаминов, тогда как растения при нормальных условиях развития полностью обеспечивают себя необходимыми витаминами (за исключением витамина В12). Микроорганизмы также синтезируют большинство необходимых им витаминов. Исходя из этого видно, что продукты растительного и микробного происхождения представляют собой незаменимые источники витаминов как для животных, так и для человека.

Удовлетворение потребности этих организмов в витаминах осуществляется двумя путями — поступление с пищей и синтез микрофлорой желудочно-кишечного тракта. Для организмов с однокамерным желудком, имеющим значительно меньше микрофлоры, главный путь обеспечения витаминами — потребление с пищей или непосредственно витаминов, или их метаболитических предшественников провитаминов, которые в организме человека и животных превращаются в витамины. В то же время жвачные животные, имеющие в прежелудках обильную микрофлору, способную к синтезу витаминов, значительной степени удовлетворяют свою потребность во многих витаминах за счет переваривания клеток отмерших микроорганизмов.

В связи с тем, что основные компоненты кормов сельскохозяйственных животных — продукты растительного происхождения — имеют не оптимальный

состав и постоянно меняющееся содержание необходимых животным витаминов, при составлении кормовых рационов возникает необходимость добавлять в корма препараты, обогащенные витаминами, которые получают из культур микроорганизмов. Микробиологическая промышленность нашей страны выпускает два вида кормовых витаминных препаратов — кормовой рибофлавин, содержащий витамин В2, и КМБ-12, имеющий в своем составе витамин В12.

Кормовые препараты витамина В2. Витамин В2 (рибофлавин) по химической природе представляет собой азотистое основание 6,7-диметилизоаллоксазин, соединенное со остатком спирта D-рибита:



о  
витамин В<sub>2</sub>

Этот витамин входит в состав активных групп окислительно-восстановительных ферментов — флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД). Поэтому при его недостатке наблюдается ослабление окислительно-восстановительных процессов в организме. По нормам кормления свиньям этого витамина требуется не менее 2—7 мг, лошадям и птице — 2—5 мг на 1 кг сухого корма. Однако в растительной продукции, используемой в кормопроизводстве, витамина В2 содержится недостаточно. Много рибофлавина могут синтезировать микроорганизмы — различные виды бактерий, актиномицеты, дрожжевые клетки, некоторые из них способны накапливать в культуральной среде до 1 мг/мл витамина В2.

В качестве промышленных продуцентов кормового рибофлавина используются отселектированные штаммы дрожжей *Eremothecium ashbyii*. Рибофлавин накапливается в вакуолях дрожжевых клеток и придает культуре характерную желтую окраску. Для производственной ферментации готовятся отдельно жидкая питательная среда и посевной материал культуры дрожжей, выращенный в специальном посевном аппарате.

Питательная среда в необходимых концентрациях включает соевую муку, кукурузный экстракт, мел, гидрол, сахар, К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>, NaCl. Перед подачей в ферментер она подвергается стерилизации. В качестве посевного материала используются споры *E. ashbyii*, выращенные на пшенице.

Промытое пшено в течение 30—35 мин выдерживается в молочной сыворотке для набухания, затем оно подсушивается и расфасовывается по 50—60 г в простерилизованные флаконы. В флаконах пшено подвергается трехкратной стерилизации, после чего производится его засев водной суспензией спор культуры дрожжей. Флаконы с засеянной культурой в течение 7—8 дней инкубируют при 29—30 °С, после чего подсушивают в вакуум-сушильной установке и далее направляют

для приготовления жидкого посевного материала, который после стерилизации подается в производственный ферментер.

Культивирование продуцентов кормового рибофлавина проводится при 28–30 °С в течение 72 ч. Через каждые 8 ч ферментации отбираются пробы для контроля за развитием микробных клеток, составом среды и накоплением целевого продукта. Готовая культуральная жидкость по окончании ферментации должна содержать до 5 % сухих веществ и 1,4 мг/мл рибофлавина.

В целях стабилизации витамина в процессе высушивания культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до рН 4,5–5,0, после чего она концентрируется в вакуум-выпарной установке. Полученный концентрат обычно содержит 5,6 мг/мл витамина и 20 % сухих веществ. После выпаривания избытка растворителя концентрат рибофлавина высушивается на распылительной сушилке до влажности 5–10 %, затем смешивается с отрубями или кукурузной мукой и расфасовывается по 20 кг в полиэтиленовые пакеты, которые упаковываются в крафт-мешки. В готовом продукте содержится не менее 1 % витамина. Срок хранения сухого препарата — 1 год.

*Кормовые препараты витамина B<sub>12</sub>.* Витамин B<sub>12</sub> представлен группой биологически активных веществ, содержащих в своем составе трехвалентный кобальт, аминные и цианистые группировки, которые могут быть замещены другими радикалами — OH, Cl, Br. Этот витамин стимулирует образование крови в костном мозге, улучшает усвоение белков, участвует в синтезе аминокислот и азотистых оснований. Витамин B<sub>12</sub> не содержится в продуктах растительного происхождения и его единственным источником для сельскохозяйственных животных являются микроорганизмы.

Для промышленного получения кормовых препаратов витамина B<sub>12</sub> выращивается специально подобранный биоценоз микроорганизмов, осуществляющих термофильное метановое брожение, в который входят целлюлозоразлагающие, аммонифицирующие, углеводсбраживающие, сульфитвосстанавливающие и метанообразующие бактерии. На первом этапе ферментации этих микроорганизмов (в течение 10–12 дней) наблюдается бурное развитие термофильных аммонифицирующих и углеводсбраживающих бактерий, которое происходит в слабокислой среде (рН 5,0–7,0). Другие группы бактерий данного биоценоза достигают интенсивного развития при переходе брожения в щелочную фазу (рН 7,0–8,5). Преобладающими в этот период являются метанообразующие бактерии, которые синтезируют в 4–5 раз больше витамина B<sub>12</sub>, чем другие микроорганизмы биоценоза. Главные субстраты для развития метанообразующих бактерий — жирные кислоты и низшие спирты, поэтому их добавление в питательную среду значительно увеличивает выход витамина.

Для приготовления питательной среды обычно используется барда ацетоно-бутилового производства, которая декантацией очищается от твердых примесей, в нее добавляется хлорид кобальта (4 г/м<sup>3</sup>) и 0,5 % метанола.

В процессе промышленного культивирования бактерий вначале производится выращивание посевного материала (15–20 дней) в аппаратах емкостью 250 м<sup>3</sup>, затем посевной материал подается в железобетонные ферментеры емкостью 4200 м<sup>3</sup>, в

которых происходит метановое брожение. Свежая барда подается в нижнюю часть ферментера в количестве 25–30 % от его объема за сутки. Отбор метановой бражки, содержащей витамин В<sub>12</sub>, производится в верхней части ферментера. В течение рабочего цикла в ферментере строго контролируется рН среды, концентрация летучих жирных кислот, содержание аммонийного азота, поддерживается оптимальная температура (55–57 °С). В результате брожения образуется газовая смесь, состоящая главным образом из метана (65 %) и диоксида углерода (30 %), которая может быть использована как источник теплоты при сжигании.

Готовая культуральная жидкость, образующаяся как продукт ферментации, обычно содержит 2–2,5 % сухих веществ и 1,1–1,7 мг/л витамина В<sub>12</sub>. Для предотвращения разрушения витамина в процессе сушки культуральную жидкость подкисляют соляной или фосфорной кислотой до рН 6,3–6,5 и добавляют 0,2–0,25 % сульфита натрия.

Подготовленная таким образом культуральная жидкость дегазируется, упаривается на вакуум-выпарной установке, полученный концентрат затем высушивается в распылительной сушилке до влажности 5–10 %. В целях улучшения физических свойств сухой продукт смешивается с отрубями или кукурузной мукой, расфасовывается по 25–30 кг в полиэтиленовые пакеты и упаковывается в крафт-мешки. Содержание витамина В<sub>12</sub> в готовом кормовом препарате составляет 2,5 мг%, срок хранения сухого препарата — 1 год. Препарат имеет коммерческое название – КМБ-12 (концентратмикробный витамин). Кроме витамина В<sub>12</sub> КМБ-12 содержит также другие витамины группы В, незаменимые аминокислоты.

*Кормовые липиды и ферментные препараты.* Кроме белков, углеводов и витаминов неотъемлемым компонентом кормов сельскохозяйственных животных являются липиды, содержащие полиненасыщенные жирные кислоты — линолевою, линоленовую, арахидоновую, которые не могут синтезироваться в организме животных и, следовательно, должны поступать с пищей. Полиненасыщенные жирные кислоты, называемые незаменимыми, участвуют в построении клеточных мембран, входя в состав структурных липидов. При недостатке незаменимых жирных кислот снижается интенсивность роста сельскохозяйственных животных, угнетается их репродуктивная функция, понижается сопротивляемость организма инфекции.

Основной источник незаменимых жирных кислот для сельскохозяйственных животных — различные растительные продукты, входящие в состав кормов. Однако очень часто в растительных кормах содержится мало липидов или они имеют неблагоприятный состав жирных кислот, что ухудшает питательную ценность кормов. В целях балансирования кормовых рационов сельскохозяйственных животных по содержанию незаменимых жирных кислот осуществляется поиск новых источников биологически полноценных липидов, которые можно было бы использовать в качестве высококонцентрированных кормовых добавок. Опыты показывают, что наиболее перспективными промышленными продуцентами липидов, близкими по составу к растительным жирам и пригодными для

использования в кормовых целях, являются дрожжи и микроскопические грибы, которые чаще всего накапливают внутриклеточные липиды, однако известны виды, способные выделять липиды в культуральную жидкость. В клетках этих микроорганизмов обычно содержится от 25 до 70 % липидов в расчете на сухую массу, которые на 40—90 % представлены триацилглицеринами и на 5—50 % — фосфолипидами. В них также содержится много стероидных веществ (до 1 — 1,5 % на сухую массу), представленных главным образом эргостерином, из которого в организме животных образуется витамин D<sub>2</sub>.

Липидные компоненты дрожжей и микроскопических грибов имеют довольно благоприятный состав жирных кислот, в них много содержится олеиновой (20—50 % от общего количества жирных кислот), линолевой (до 50 %), линоленовой (до 17—19 %) кислот и мало трудноусвояемых организмом животных кислот (оксикислот, кислот с нечетным числом углеродных атомов или разветвленной цепью). Много липидов (50—60 % от сухой массы) способны накапливать некоторые штаммы дрожжей *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*. Клетки дрожжей рода *Candida* синтезируют меньше липидов (20—40 %), однако отличаются высокой скоростью роста и способностью хорошо утилизировать разнообразные источники сырья. Микроскопические грибы могут синтезировать до 40—50 % высокоценных липидов, сходных по составу жирных кислот с растительными маслами.

Из-за образования в клетках микроорганизмов активных комплексов гидролитических ферментов они способны утилизировать в качестве источников углерода различные субстраты — гидролизаты растительных отходов, послеспиртовую барду, молочную сыворотку, мелассу, отходы зерноперерабатывающей промышленности, углеводороды нефти, низкомолекулярные спирты (метанол, этанол). В качестве источника азота в питательную среду добавляют дрожжевой или кукурузный экстракт, соли аммония, мочевины, но при этом строго контролируют соотношение углерода и азота, так как при избытке азота снижается образование липидов в клетках микроорганизмов (оптимальное соотношение C : N = 320—400).

Кроме источников углерода и азота в питательную среду также добавляют P, K, Mg, Zn, Fe, Mn, витамины группы B, токоферол. В процессе выращивания на питательной среде вначале наблюдается интенсивный рост микроорганизмов и сравнительно небольшое накопление липидов. Усиленный синтез липидов отмечается в начале стационарной фазы развития микроорганизмов.

При выращивании продуцентов кормовых липидов поддерживается температура 20—30 °C, так как при более высокой температуре снижается выход липидов, а в липидах уменьшается доля полиненасыщенных жирных кислот. В процессе ферментации требуется поддерживать режим интенсивной аэрации, так как для окисления углеродных субстратов необходим кислород. Кислород также необходим для синтеза ненасыщенных жирных кислот, поэтому улучшение аэрации стимулирует увеличение выхода незаменимых жирных кислот.

По окончании ферментации микробная масса отделяется от остатков субстрата и высушивается примерно по такой же технологии, как кормовые дрожжи. Для улучшения физических свойств к высушенному продукту добавляют отруби или

кукурузную муку.

Наряду с получением кормовых липидов на основе ферментации микроорганизмов разрабатываются также технологии производства комплексных микробных препаратов, содержащих белки, липиды, каротиноиды и другие ценные питательные вещества, которые позволяют балансировать корма одновременно по нескольким компонентам. Так, например, получен высокий эффект при введении в кормовой рацион птиц белково-липидной биомассы дрожжей *Lipomyces lipoterus*, содержащей 18—20 % белков и 27—29 % липидов, а также биомассы гриба *Blakeslea trispora* с содержанием белков 30 % и липидов 28 %. Следует отметить, что липиды микроорганизмов могут быть использованы не только в кормопроизводстве, но и как заменитель растительных пищевых жиров, используемых на технические нужды (лакокрасочная, химическая промышленность), так как примерно 20 % от производимых в мире растительных жиров расходуется на технические, непищевые цели.

### ***Ферментные препараты.***

Одним из важных направлений современной биотехнологии является получение на основе культивирования микроорганизмов и использование в сельском хозяйстве различных ферментных препаратов, которые могут применяться в процессе приготовления кормов для сельскохозяйственных животных как добавки к кормам для улучшения их усвояемости, а также в ветеринарии для профилактики и лечения желудочных и паразитарных заболеваний.

Основной компонент кормов сельскохозяйственных животных — растительная продукция (зерно, силос, грубые корма и др.), содержащая довольно много трудноперевариваемых веществ, — клетчатка, лигнин, гемицеллюлоза. Даже у жвачных животных, содержащих в преджелудке (рубце) активные штаммы целлюлозоразлагающих микроорганизмов, клетчатка переваривается на 40—65 %. Не полностью перевариваются также растительные белки (60—80 %), липиды (60—70 %), крахмал и полифруктозиды (70—85 %), пектиновые вещества.

Для улучшения перевариваемости и повышения эффективности использования растительных кормов в рационы сельскохозяйственных животных вводят ферментные препараты (0,1—1,5 % от сухой массы корма), полученные из микроорганизмов и содержащие активные комплексы гидролитических ферментов. Препараты микробных ферментов обычно получают из культур бактерий или микроскопических грибов (табл. 6.5). Некоторые виды бактерий (например, *Vac. Subtilis*) выделяют гидролитические ферменты в культуральную среду, поэтому их ферментные препараты производят путем концентрирования и высушивания при определенных условиях (лиофилизацией) культуральной жидкости. Если источником ферментов являются микроскопические грибы (*Aspergillus, Trichoderma, Fusarium*), то ферментный препарат готовят высушиванием поверхностной культуры этих микроорганизмов. Очищенные ферментные препараты получают экстракцией ферментов из клеток микроорганизмов подходящим растворителем и осаждением фермента этанолом.

Каждый ферментный препарат обозначается определенным буквенным и цифровым индексом. Буква «Г» в названии препарата указывает на то, что он получен из культуральной жидкости при глубинном способе выращивания микроорганизмов, тогда как буква «П» свидетельствует о том, что ферментный препарат получен из поверхностной культуры микроскопических грибов. Индекс «2» в названии препарата показывает, что это концентрированный сироп, «3» — сухой ферментный препарат, «10» — очищенный ферментный препарат. Индекс «Пх» обозначает, что ферментный препарат представляет собой высушенную поверхностную культуру грибов.

В рационе крупного рогатого скота значительный удельный вес занимают сочные и грубые корма, богатые клетчаткой, пентозанами, пектиновыми веществами, которые медленно перевариваются микроорганизмами рубца, снижая усвояемость организмом других питательных веществ. Значительное улучшение перевариваемости этих веществ наблюдается при добавлении в корм ферментных препаратов с активным комплексом гидролитических ферментов, таких как пектофоедин ГЗх и целловиридин ГЗх (в соотношении 1:1), амилосубтилин ГЗх и глюкаваморин Пх. При этом не только повышается общая продуктивность животных, но и существенно снижается расход кормов на создание одной единицы животноводческой продукции (на 8—10 %).

При откорме свиней положительное действие оказывают ферментные препараты с амилолитической и протеолитической активностью — амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх, амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, протезим ГЗх.

Особенно важное значение имеет применение ферментных препаратов при кормлении молодняка сельскохозяйственных животных. Так, например, у телят формирование рубца происходит к 2—3-месячному возрасту, вследствие чего наблюдается слабое переваривание грубых и сочных кормов. Поэтому для замены молока растительными кормами и лучшего их использования в рацион телят целесообразно вводить ферментные препараты — пектофоедин ГЗх, амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх и глюкаваморин Пх, содержащие комплекс амилолитических и протеолитических ферментов.

У поросят-сосунов ферментные системы желудочно-кишечного тракта начинают нормально функционировать лишь в 3—4-месячном возрасте и для улучшения перевариваемости питательных веществ корма им рекомендуется добавлять в корм ферментный препарат протезим ГЗх. При кормлении ягнят в целях улучшения перевариваемости белков и углеводов в их кормовые рационы вводят глюкаваморин Пх и амилоризин Пх, в результате чего привесы увеличиваются на 11 — 15%.

Пищеварительные железы птиц не образуют ферменты, катализирующие гидролиз клетчатки и пектиновых веществ, а микрофлора кишечника у них малочисленна, поэтому в их кормовые рационы добавляют ферментные препараты с целлюлолитической, пектолитической и протеолитической активностью — пектофоедин ГЗх, целловиридин ГЗх, амилосубтилин ГЗх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх, протосубтилин ГЗх, гликозидазу ГЗх, лизоцим ГЗх, протезим ГЗх. В результате применения указанных препаратов яйценосность кур повышается на 5 %, привесы бройлеров увеличиваются на 7—15 %, тогда как расход корма на

создание единицы продукции снижается на 4-7 %.

Применение ферментных препаратов также эффективно при кормлении рыб. При добавлении в кормовые рационы рыб протосульфатина ГЗх, амилосульфатина ГЗх, пектаваморина Пх в количестве 0,1—0,15 % значительно улучшается перевариваемость белков и других питательных веществ корма.

Ферментные препараты используются также в кормопроизводстве чаще всего при силосовании бобовых трав, соломы, картофеля и приготовлении соломоконцентратов. Зеленая масса бобовых трав содержит большое количество буферных веществ (белки, аминокислоты, щелочные соли), которые препятствуют понижению рН в процессе молочнокислого брожения, кроме того, в ней имеется недостаточно сахаров, являющихся субстратами молочнокислых бактерий. Если путем добавления ферментов обеспечить частичный гидролиз полисахаридов — клетчатки, крахмала, пектиновых веществ, гемицеллюлоз, то образуется больше сахаров для жизнедеятельности молочнокислых бактерий, в результате в силосируемой массе повышается концентрация молочной кислоты, обеспечивая снижение потерь питательных веществ и улучшение питательных свойств полученного таким путем корма. Хорошую эффективность при силосовании бобовых трав показали следующие ферментные препараты: целловиридин ГЗх, пектофоетидин ГЗх, пектаваморин Пх, глюкаваморин Пх, целлокандин ГЗх, целлолигнорин Пх. При силосовании картофеля рекомендуется применять амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх, при этом кормовая ценность получаемой силосной массы повышается на 15—18%.

Ферментные препараты имеют существенное значение в технологиях приготовления кормов из соломы злаковых культур. Солома характеризуется высоким содержанием трудноусвояемых веществ — целлюлозы, ксиланов, лигнина — и низким содержанием белков. В ней почти нет растворимых углеводов, необходимых для развития молочнокислых бактерий. Поэтому при силосовании соломы применяются целлюлозоразлагающие ферментные препараты — целловиридин ГЗх, целлолигнорин Пх, целлокандин ГЗх, пектаваморин Пх. В результате действия этих препаратов в силосируемой массе повышается концентрация растворимых сахаров, за счет синтеза микроорганизмами увеличивается содержание сырого протеина (на 50 %).

Для получения соломоконцентратов обычно применяется смесь двух ферментных препаратов пектофоетидина ГЗх и глюкаваморина Пх, которые обеспечивают гидролиз полисахаридов. Затем на продуктах гидролиза выращивают кормовые дрожжи. Для лучшего роста дрожжей в соломоконцентрат добавляют мелассу, мочевины, кальций монофосфат, хлорид натрия, необходимое количество воды. Получаемый таким способом корм имеет консистенцию силоса, а по питательной ценности приближается к хорошему луговому селу.

Соломоконцентраты могут быть получены в гранулированном виде и в этом случае могут сохранять свои питательные свойства длительное время — до 1 года. Переваримость клетчатки в таком корме повышается до 75—80 %, содержание белков достигает 10—12 % от сухой массы.

Ферментные препараты применяются в процессе получения заменителей



цельного молока для молодняка крупного рогатого скота из кормовых дрожжей, которые подвергаются гидролизу. В результате гидролиза разрушается клеточная оболочка дрожжевых клеток и микробная биомасса переводится в легкоусвояемую форму, повышается содержание растворимых углеводов, незаменимых аминокислот и полиненасыщенных жирных кислот. Для гидролиза кормовых дрожжей обычно используют препараты — пектофоетидин ГЗх, дрожжелитин ГЗх, лизосубтилин ПОх.

Микробные ферментные препараты широко применяют в ветеринарии для лечения и диагностики многих заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц. Например, ферменты, способные разрушать клеточную оболочку и обладающие лизирующим действием, используются в лечении бактериальных и других заболеваний (сальмонеллез и популлез у птиц, эндометриты у коров и др.). Для этих целей применяются выпускаемые промышленностью ферментные препараты — лизоцим ГЗх, гликозидаза ГЗх, лизосубтилин ПОх, мальтаваморин ПОх, дрожжелитин ГЗх.

В результате того, что амилосубтилин ГЗх и протосубтилин ГЗх оказывают влияние на редуцирующую способность бактерий в желудочно-кишечном тракте животных, количество и подвижность инфузорий, переваривание целлюлозы и других трудноусвояемых углеводов, эти препараты используют для профилактики и лечения желудочных заболеваний, в частности алиментарных атоний преджелудков у жвачных животных. Ферменты, содержащиеся в этих препаратах, вызывают также гидролиз оболочек яиц гельминтов.

Наряду с производством ферментных препаратов, выделяемых из микробных клеток, разработаны технологии получения биопрепаратов на основе живых микроорганизмов — симбионтов желудочно-кишечного тракта животных, которые в процессе своей жизнедеятельности синтезируют различные ферменты, витамины, незаменимые аминокислоты, антибиотики, вещества, обладающие гормональным действием, и таким образом активно участвуют в процессах пищеварения и синтеза веществ, не образующихся в клетках животных, защите от микробной инфекции.

Эффективные микробные препараты, широко используемые в животноводстве, производятся на основе пропионовокислых (пропиовит) и ацидофильных (пропиацид) бактерий, а также азотобактерий (азотацид).

*Пропиовит* представляет собой порошок серовато-песчаного цвета, содержащий в 1 г препарата 4–6 млрд бактерий и 80–100 мкг витамина В12» применяется для профилактики и лечения болезней желудочно-кишечного тракта у телят, поросят, цыплят. При его применении нормализуется рост и развитие молодняка сельскохозяйственных животных, повышается их устойчивость к инфекционным заболеваниям.

*Пропиацид* и *азотацид* — сухие препараты комбинированного действия, способствуют образованию в желудочно-кишечном тракте животных уравновешенных биоценозов, особенно они эффективны против дисбактериозов.

Для борьбы с бактериальными и вирусными желудочно-кишечными заболеваниями применяются бактериальные препараты на основе *Bac. subtilis*, *licheniformis*, *mucilaginosus*, которые, вероятно, действуют как источники

биологически активных веществ – ферментов, витаминов, антибиотиков, гормонов.

Важной задачей ученых и специалистов, работающих в области сельскохозяйственной биотехнологии, является создание и внедрение в природные экосистемы желудочно-кишечного тракта животных высокоактивных штаммов микроорганизмов, способных к лучшему перевариванию целлюлозы и других углеводов, растительных белков и липидов, сверхсинтезу незаменимых аминокислот и витаминов. Важное значение имеют исследования по изучению микробных популяций рубца (преджелудка) жвачных животных, в котором подвергается перевариванию 70—85 % всего сухого вещества корма, проходящего через желудочно-кишечный тракт этих животных.

Рубец представляет собой высокоэффективную природную систему непрерывного культивирования анаэробных микроорганизмов — бактерий (*Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Eubacterium* и др.) и простейших (*Diplodinium*, *Entodinium*, *Ophryoscolex*, *Isotricha* и др.).

Слизистая оболочка рубца не образует собственных ферментов, и процесс переваривания пищи полностью происходит с помощью ферментных белков, вырабатываемых микроорганизмами. В результате жизнедеятельности микрофлоры в преджелудках жвачных животных гидролизуются практически все формы сложных углеводов (крахмал, пектиновые вещества, гемицеллюлозы, клетчатка, дисахариды), белки и липиды, подвергаются брожению моносахариды (глюкоза, фруктоза, манноза). Образующиеся в результате гидролиза сложных веществ моносахариды, аминокислоты и жирные кислоты используются животными в качестве источников энергии и в биосинтетических процессах. Сами микроорганизмы после их отмирания также перевариваются в рубце и становятся для животных источниками полноценных белков, незаменимых аминокислот, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов.

Создание высокоактивных штаммов микроорганизмов и сбалансированных экосистем желудочно-кишечного тракта животных проводится как обычными методами генетики и селекции, так и с использованием мутагенеза и клонирования генов. Применение этих методов позволит целенаправленно изменять экосистемы желудочно-кишечного тракта животных в нужном направлении, добиваясь улучшения усвояемости корма, усиления синтеза полезных веществ, подавления патогенной микрофлоры.

## **7. BIOTECHNOLOGICAL ALTERNATIVES IN AGRICULTURE.**

### ***Защита растений от фитопатогенов и возможности генной инженерии.***

*Биопестициды.* Практически одновременно с развитием животноводства и растениеводства возникла проблема защиты культурных растений и домашних животных от вредителей и болезней. Сначала человек использовал примитивные средства истребления и отлова вредных животных, затем для уничтожения стал применять хищных животных (собак, кошек, птиц). Постепенно, с развитием

сельскохозяйственных технологий способы борьбы совершенствовались; появились первые примитивные химические средства уничтожения насекомых и грызунов с использованием отваров, настоев, древесной золы и пр. Бурное развитие химии и переход сельского хозяйства на интенсивные технологии привело к появлению и применению огромного разнообразия химических веществ для борьбы с вредителями и болезнями культивируемых видов. Первоочередное место заняли пестициды ядовитые химические вещества, используемые для борьбы с вредителями, болезнями и сорняками. Однако только небольшая часть (около 10%) применяемых и вносимых в окружающую среду пестицидов достигает цели; основная же масса этих веществ вызывает гибель полезных организмов, аккумулируется в биологических объектах, нарушает равновесие в природных экосистемах и биоценозах, загрязняет почвы, водоемы, воздух. Химические пестициды не обеспечили при этом полную защиту сельскохозяйственных культур; большое число насекомых и сорняков остались неконтролируемыми и продолжают наносить огромный вред сельскому хозяйству. Более того, вредители начинают приобретать резистентность к пестицидам. Появились данные о том, что для уничтожения некоторых вредителей приходится применять сверхвысокие дозы пестицидов, в тысячи раз превосходящие начальные дозы токсикантов в первые годы их применения. В настоящее время в литературе описаны сотни видов членистоногих, резистентных к различным пестицидам (ДДТ, карбаматам, пиретроидам, фосфорорганическим соединениям). Таким образом, применение пестицидов вступило в явное противоречие с глобальной проблемой защиты окружающей среды.

Это вызывает необходимость поиска других, более эффективных средств и методов защиты, не оказывающих отрицательного воздействия на человека и окружающую среду в целом. Большие перспективы среди разрабатываемых подходов имеют биологические методы.

Биологические агенты применяли разрабатываемых подходов имеют биологические методы.

Биологические агенты применяли для уничтожения вредителей с древнейших времен. Например, китайцы использовали фараоновых муравьев для уничтожения вредителей в зернохранилищах. Во времена Аристотеля в период интенсивного одомашнивания пчел и тутового шелкопряда человек сталкивался с массовыми заболеваниями этих насекомых. Этот период можно считать началом зарождения микробиологических методов борьбы с вредителями. Но только в конце XIX века работами Л. Пастера и И.И. Мечникова была заложена научная основа этого направления. Мечникову удалось выделить возбудителя болезни хлебного жука мускаринный гриб (*Metarrisium anisopliae*), и он рекомендовал использовать данную культуру для борьбы с жуком - вредителем злаковых. Пастер предложил применять бактерию возбудитель куриной холеры для борьбы с дикими кроликами; Мечников этого же возбудителя для уничтожения сусликов. С тех пор направление, основанное на использовании микроорганизмов природных патогенов, для борьбы с возбудителями болезней и вредителями культурных биологических видов в природных условиях, непрерывно совершенствуется. Выделено и описано

множество микроорганизмов, патогенных для грызунов и насекомых, и на их основе созданы и продолжают разрабатываться эффективные препараты.

### ***Биопестициды.***

Использование микроорганизмов в качестве биопестицидов сравнительно новое направление биотехнологии, но уже имеющее существенные достижения. В настоящее время бактерии, грибы, вирусы находят все более широкое применение в качестве промышленных биопестицидов. Технология производства этих препаратов весьма различна, как различна природа и физиологические особенности микроорганизмов-продуцентов. Однако имеется ряд универсальных требований, предъявляемых к биопестицидам, основными среди них являются: селективность и высокая эффективность действия, безопасность для человека и полезных представителей флоры и фауны, длительная сохранность и удобство применения, хорошая смачиваемость и прилипаемость. В настоящее время для защиты растений и животных от насекомых и грызунов применяются, помимо антибиотиков, около 50 микробных препаратов, относящихся к трем группам: это бактериальные, грибные и вирусные препараты.

*Бактериальные препараты.* К настоящему времени описано свыше 90 видов бактерий, инфицирующих насекомых. Большая их часть принадлежит к семействам Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae, Bacillaceae. Большинство промышленных штаммов принадлежит к роду Bacillus, и основная масса препаратов (свыше 90%) изготовлена на основе Bacillus thuringiensis (Bt), имеющих свыше 22 серотипов. Штаммы Bt используют для борьбы с различными вредителями гусеницами, комарами, мошкой.

Впервые Bt была выделена в 1915 г. Берлинером из больных гусениц мельничной огневки. Штаммы Bacillus thuringiensis, помимо образования спор, которые при попадании внутрь насекомого вызывают септицемию, синтезируют также ряд экзо- и эндотоксинов. Первый токсин, идентифицированный у Bt, а экзотоксин (фосфолипаза C), является продуктом растущих клеток, предполагают, что эффект данного токсина, детальный для насекомых, связан с распадом в тканях незаменимых фосфолипидов. Второй токсин B-экзотоксин, состоящий из аденина, рибозы и фосфора. Предполагают, что его молекула представляет собой нуклеотид, сложно

Предполагают, что его молекула представляет собой нуклеотид, сложно связанный через рибозу и глюкозу с аллослизиевой кислотой, а его токсическое воздействие состоит в прекращении синтеза насекомыми РНК. Третий токсин -  $\gamma$ -экзотоксин. Его структура и действие мало изучены; предполагают, что он относится к фосфолипидам. Четвертый токсин кристаллический б-эндотоксин, образуется одновременно со спорой и выделяется в среду. Интактные кристаллы нетоксичны, но при попадании в пищеварительный тракт насекомых под воздействием щелочных протеаз разрушаются с образованием действующего токсина. Кристаллические эндотоксины полипептидной структуры классифицированы в четыре группы: токсины, активные в отношении чешуекрылых (молекулярная масса 130-160 кД);

активные в отношении чешуекрылых и двукрылых (70); активные в отношении жесткокрылым (72 кД) и активные по отношению к личинкам двукрылых (состоят из нескольких активных белков молекулярной массы от 27 до 130 кД). Специфичность протеаз насекомых различных видов определяет разницу воздействия токсина. Не все насекомые обладают протеазами, способными разрушать данный токсин, чем и определяется его избирательность.

Препараты на основе Vt относятся к токсинам кишечного действия. Типичными последствиями их воздействия являются паралич кишечника, прекращение питания, развитие общего паралича и гибель насекомого. Кристаллы варьируют между различными серотипами и изолятами В и обладают широким спектром активности против различных насекомых.

Бактерии группы *Bacillus thuringiensis* эффективны в отношении 400 видов насекомых, включая вредителей полей, леса, садов и виноградников; наибольший эффект от применения данных препаратов получают при борьбе с листогрызущими вредителями. Известно более 100 штаммов Vt, объединенных в 30 групп по серологическим и биохимическим признакам. Микробиологическая промышленность многих стран выпускает различные препараты на основе Vt, способных образовывать споры, кристаллы и токсические вещества в процессе роста. Технология получения биопестицидов на основе энтомопатогенных бактерий представляет собой типичный пример периодической гомогенной аэробной глубинной культуры, реализующейся в строго стерильных и контролируемых условиях. Цель процесса получение максимального урожая бактерий и накопление токсина. Основу питательной среды составляет дрожжеполисахаридная смесь и пеногаситель (кашалотовый жир). Длительность ферментации при 28-30°C в режиме перемешивания и аэрации (0,2 л среды мин.) составляет 35-40 часов до накопления в культуральной жидкости 5-10% свободных спор и кристаллов от общего их количества (при титре культуры не менее 1 млрд. спор в 1 мл). Далее споры и кристаллы отделяются в процессе сепарирования и обезвоживаются. Товарная форма препарата сухой порошок, а также стабилизированная паста. Выход пасты при влажности 85% и титре около 20 млрд. спор/г - около 100 г/м<sup>3</sup> культуральной жидкости. Стабилизация пасты осуществляется смешиванием ее с карбоксиметилцеллюлозой, обладающей высокой сорбционной емкостью. Споры и кристаллы в результате стабилизации образуют трехмерную сетчатую структуру, в которую равномерно проникает консервант, обеспечивая длительную сохранность препарата. На основе пасты в процессе высушивания в распылительной сушилке получают сухой продукт с остаточной влажностью не выше 10% и с титром 100-150 млрд. спор/г. Препарат усредняется и стабилизируется каолином. Готовый сухой продукт содержит до 30 млрд. спор/г.

Узким местом при производстве энтомопатогенных бактериальных препаратов является борьба с фаголизисом. Есть предположение, что вирулентность и фагоустойчивость бактериальных штаммов находятся в обратной зависимости, поэтому невозможно сочетать эти свойства в одном штамме. Для избавления от фаголизиса ведется селекция на фагоустойчивость среди производственных штаммов; рекомендована смена культивируемых штаммов, а также строгая

регламентируемость и стерильность на стадии ферментации.

Первый отечественный препарат получен на основе *Bac. thuringiensis var. dalleriae* - энтобактерин. Препарат выпускается в виде сухого порошка с содержанием спор и кристаллов эндотоксина по 30 млрд./г, пасты с наполнителем, а также жидкости в смеси с прилипателем. Эффективен против чешуекрылых насекомых (капустной белянки, капустной моли, дугового мотылька, пяденицы, шелкопряда, боярышницы и др.). Применяют препарат путем опрыскивания растений суспензией из расчета 1- 3 кг/га для овощных и 3-5 кг/га для садовых культур с использованием споры и кристаллы отделяются в процессе сепарирования и обезвоживаются. Товарная форма препарата сухой порошок, а также стабилизированная паста. Выход пасты при влажности 85% и титре около 20 млрд. спор/г - около 100 г/м<sup>3</sup> культуральной жидкости. Стабилизация пасты осуществляется смешиванием ее с карбоксиметилцеллюлозой, обладающей высокой сорбционной емкостью. Споры и кристаллы в результате стабилизации образуют трехмерную сетчатую структуру, в которую равномерно проникает консервант, обеспечивая длительную сохранность препарата. На основе пасты в процессе высушивания в распылительной сушилке получают сухой продукт с остаточной влажностью не выше 10% и с титром 100-150 млрд. спор/г. Препарат усредняется и стабилизируется каолином. Готовый сухой продукт содержит до 30 млрд. спор/г.

Узким местом при производстве энтомопатогенных бактериальных препаратов является борьба с фаголизисом. Есть предположение, что вирулентность и фагоустойчивость бактериальных штаммов находятся в обратной зависимости, поэтому невозможно сочетать эти свойства в одном штамме. Для избавления от фаголизиса ведется селекция на фагоустойчивость среди производственных штаммов; рекомендована смена культивируемых штаммов, а также строгая регламентируемость и стерильность на стадии ферментации.

Первый отечественный препарат получен на основе *Bac. thuringiensis var. dalleriae* - энтобактерин. Препарат выпускается в виде сухого порошка с содержанием спор и кристаллов эндотоксина по 30 млрд./г, пасты с наполнителем, а также жидкости в смеси с прилипателем. Эффективен против чешуекрылых насекомых (капустной белянки, капустной моли, дугового мотылька, пяденицы, шелкопряда, боярышницы и др.). Применяют препарат путем опрыскивания растений суспензией из расчета 1- 3 кг/га для овощных и 3-5 кг/га для садовых культур с использованием 3 кг/га для овощных и 3-3 кг/га для садовых культур с использованием наземных и авиационных опрыскивателей. Оптимальные условия внешней среды для применения энтобактерина отсутствие осадков и диапазон температур 18-32°C. Препарат кишечного действия, при поедании гусеницами вместе с листовой зеленью после попадания в желудочно-кишечный тракт насекомого вызывает общую интоксикацию и затем полный паралич. Основная масса насекомых гибнет в течение 2-10 дней; при необходимости проводят повторную обработку при сокращении дозы в 2 раза. Применение энтобактерина повышает урожайность овощных культур и садовых культур на 50 и 5 ц/га соответственно.

Дендробациллин является препаратом для защиты леса от сибирского

шелкопряда на основе *Bac. thuringiensis var dendrolimus*. Бактерия была выделена из гусениц сибирского шелкопряда вредителя хвойных лесов. Этот препарат также эффективен для защиты овощных, плодовых и технических культур от разных насекомых (совок, белянок, молей, пядениц и др.). Препарат не токсичен для полезной энтомофауны, исключение составляют тутовый и дубовый шелкопряд, применяется и действует аналогично энтобактерину.

Инсектин - по действию аналогичен дендробациллину, предназначен для борьбы, главным образом, с сибирским шелкопрядом. Получен на основе *Bac. thuringiensis var. insectus*.

БИП - биологический инсектицидный препарат, изготавливается в виде сухого порошка и пасты на основе *Bac. thuringiensis var. darmstadiensis*; эффективен против вредителей плодовых (от яблочной и плодовой молей, пядениц, листоверток, шелкопрядов) и овощных культур (белянок, молей).

Бактулоцид - бактерия, на основе которой выпускается данный препарат, выделена из водоема и отнесена к группе Bt H14, так как ей присвоен 14-й серотип. Бактулоцид выпускается в виде сухого порошка с титром спор около 90 млрд./г и содержит такое же количество кристаллов. Применяется в жидком виде разбрызгиванием по поверхности водоема. Доза в зависимости от характера водоема и вида комаров варьирует от 0.5 до 3.0 кг/га водной поверхности. Кристаллический эндотоксин бактулоцида высокотоксичен для личинок комаров и мошек, но совершенно безопасен для других насекомых и гидробионтов, обитающих в одном водоеме с комарами. Продуцент данного эндотоксина привлек внимание ученых многих стран. За рубежом аналогичные препараты («Текнар», «Скитал», «Виктобак», «Бактимос») для борьбы с комарами и мошкой выпускают на основе бактерии *Bacillus israelensis* штамм Bt H, которая продуцирует данный эндотоксин. Наиболее эффективными являются отечественный «Бактулоцид» и французский «Бактимос».

Вторая группа препаратов, выпускаемых за рубежом, базируется на бактериальном серотипе *Bac. thuringiensis* 3A3B (HD-1). Первый препарат был получен во Франции в 1938 г. на основе штамма, выделяющего опасный для человека токсин В. Были разработаны специальные методы очистки культуральной жидкости для удаления токсина из товарной формы продукта. Впоследствии был выделен штамм В HD-1 свободный от дан продукта. Впоследствии был выделен штамм Bt HD-1, свободный от данного эндотоксина, который в настоящее время является основой многих промышленных препаратов, предназначенных для борьбы с различными садовыми и огородными вредителями. Серия препаратов, по действию аналогичная энтобактерину, («Дипел», «Виобит», «Бактоспейн») изготавливается на основе 3A3B в виде порошков и жидкостей и применяется с помощью распылительных и разбрызгивающих устройств, вызывая массовую гибель гусениц. В Чехии производят препарат «Батурин-82» с использованием глубинной культуры *Bt. var. kurstaki*, эффективный против различных вредителей овощных, зерновых культур и лесов. В США начат выпуск препарата «Фоил» на основе конъюгатов двух штаммов Bt, для борьбы с гусеницами овощных культур и ряд других эффективных препарат

Широкая разработка новых препаратов на основе Vt интенсивно проводится во многих странах. Поиск осложняется нестабильностью и лизогенией штаммов-продуцентов. До настоящего времени мало изучены вопросы контагиозности энтомопатогенных бактерий и возможности эпизоотологического способа их использования.

Методы генной и клеточной инженерии в настоящее время позволяют проводить работы, направленные на улучшение существующих продуцентов и продуктов Vt. Сегодня известно, что гены, контролирующие синтез кристаллов, локализованы на небольшом числе плазмид значительной молекулярной массы. Токсический белок, синтезируемый Vt, клонирован в *E. coli* и *B. subtilis*, его экспрессия получена даже в течение вегетативной фазы роста. Есть сведения о клонировании белка, токсичного для бабочек, в клетках табака. В выросшем целом растении табака каждая клетка вырабатывала токсин. Таким образом, растение, приобретшее токсин, само становится устойчивым к насекомым: поедая листья, гусеница погибает, не причинив существенного вреда растению. Американскими компаниями «Монсанто» и «Агроцетус» проводятся полевые испытания хлопчатника с внедренным в хромосому геном Vt. Резистентность к гусеницам передается семенам и последующим поколениям растений. Начато получение рассады трансгенного картофеля и томатов с внедренным геном Vt, токсичного для чешуекрылых. Создан трансгенный инсектоустойчивый тополь с внедренным геном антитрипсиназы в клетки тканей. Фермент снижает усвоение белка насекомыми, что приводит к сокращению популяции.

Соединение и клонирование белков из различных энтомопатогенных штаммов позволило получить рекомбинантные штаммы с расширенным спектром активности. Описаны новые штаммы с активностью против дополнительных насекомых (например, жесткокрылых). Фирма «Сандоз» успешно провела полевые испытания нового продукта «Джавелин», полууспешно провела полевые испытания нового продукта «Джавелин», полученного на основе NRD-12, штамма ЗАЗВ, исходно активного против непарного шелкопряда. Препарат эффективен также против вредителей овощных культур, а также культур хлопчатника. Генноинженерными методами в США создан эндофит *Calvibacter xylicynodontis*, модифицированный экспрессией гена токсина Vt. Препарат «Инсайд» вводится в семена кукурузы, после их прорастания бактерии размножаются в сосудистой системе растения, продуцируя биоинсектицид; эффективен против мотылька кукурузного. Компания «Микоген» выпускает на рынок генноинженерный препарат на основе токсина Vt. var. san diego, экспрессированного в бактерии *Ps. fluorescens*, препарат может применяться для защиты от колорадского жука и долгоносика картофеля, баклажан, томатов; его стоимость близка к стоимости химических пестицидов, эффективность действия свыше 90%.

Новейшие биотехнологические методы могут способствовать повышению эффективности бактериальных препаратов в результате изменения плазмид в бактериях, контролирующих синтез белка. Производство аспорогенных штаммов может упростить технологию ферментации и снизить стоимость препаратов. Возможно получение биоинсектицидов с более специфичными мишенями.



*Грибные препараты.* Многочисленные виды энтомопатогенных грибов широко распространены в природе; они поражают широкий круг насекомых, обладая для этого различными механизмами, включая контактный, что облегчает их применение. Грибы хорошо сохраняются в виде спор и продуцируют разнообразные биологически активные вещества, усиливающие их патогенность. Однако грибные препараты не применяются пока достаточно широко. Это связано, во-первых, с определенными технологическими трудностями, возникающими при их культивировании и, во-вторых, обусловлено жесткими требованиями к факторам окружающей среды (высокая активность грибных препаратов проявляется только в условиях высокой и стабильной влажности).

Известны сотни видов энтомопатогенных грибов, но наиболее перспективными считаются две группы грибов мускаринные грибы из Euascomycetes и энтомотрофные из семейства Entomophthoraceae. Основное внимание привлекают следующие грибные патогены: возбудитель белой мускардины (род *Beauveria*), возбудитель зеленой мускардины (род *Metarhizium*) и *Entomophthora*, (поражающий сосущих насекомых). И. И. Мечников, открыв возбудителя зеленой мускардины у хлебного жука и применив препарат из гриба *Metarhizium anisopliae*, заложил основу новому направлению защиты растений. У большинства грибов возбудителем инфекции являются конидии. Грибы в отличие от бактерий и вирусов, проникают в тело насекомого не через пищеварительный тракт, а непосредственно через кутикулу. При прорастании конидий на кутикуле насекомого ростовые трубки могут развиваться на поверхности или сразу начинают прорастать в тело; часто этот процесс сопровождается образованием токсина. Если штамм слабо продуцирует токсин, мицелий достаточным количеством токсина. Если штамм слабо продуцирует токсин, мицелий достаточно быстро заполняет все тело насекомого. Заражение насекомых грибными патогенами в отличие от других микроорганизмов может происходить на различных стадиях развития (в фазе куколки или имаго). Грибы быстро растут и обладают большой репродуктивной способностью. Для того чтобы применение грибных препаратов было эффективным, надо применять их в определенное время сезона и в оптимальной концентрации. Для этого необходимо знание этиологии грибных повреждений и как они взаимодействуют с насекомыми. Это обеспечит получение на основе грибов эффективных и достаточно экономичных пестицидов. В настоящее время, несмотря на имеющиеся ограничения, грибные препараты широко исследуются и начинают применяться для борьбы с вредителями. *Metarhizium anisopliae* - наиболее известный энтомопатогенный гриб, описанный более 100 лет назад как зеленый мускаринный гриб. На его основе были получены первые препараты биопестицидов в промышленных масштабах. Этот гриб поражает многие группы насекомых, включая слюнного пастбищного клопа и вредителя сахарного тростника. В сочетании с вирусом препарат данного гриба используют для контроля численности жука-носорога, являющегося главным вредителем пальм на островах в южной части Тихого океана. Есть данные о том, что с его помощью можно бороться с коричневой цикадой вредителем риса.

*Verticillium lecanii* является единственным грибным энтомопатогеном, на основе которого на западе успешно выпускают препараты в промышленных масштабах. Его

изучение началось в начале 80-х годов. Этот организм способен контролировать в оранжереях численность тлей и алейроцид в течение нескольких месяцев.

*Hirsutella thompsonii* использовали некоторое время в США для производства препарата «Микар» с целью контроля численности цитрусовых клещей. Выпуск препарата, однако, был прекращен, так как он не оправдал надежд.

В США, Чехии, Австралии и на Кубе разработаны эффективные препараты на основе мускаридного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill для борьбы с вредителями различных сельскохозяйственных растений, для контроля популяции насекомых в почве. Для инфицирования саранчи в США используют австралийский микроскопический гриб *Entomophthora graxibuli*. Саранча погибает в течение 7-10 дней после применения препарата. Споры гриба после зимовки в почве способны поражать следующие поколения насекомых. В Японии выпущен в продажу инсектицид на основе гриба *Aspergillus* для защиты лесов от вредителей; препарат вносят в почву, он поглощается корнями деревьев, распространяясь по сосудистой системе дерева, защищает его от насекомых.

Боверин является отечественным грибным препаратом, который изготавливается отечественным грибным препаратом, который изготавливают на основе конидиоспор *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Препарат выпускают в виде порошка с титром 2-6 млрд. конидиоспор/г. Применяют также в комплексе с химическими препаратами (хлорофосом, фозалоном, севином) при уменьшении дозы последних в 10 раз от принятой нормы для индивидуального химического пестицида. Боверин почти также эффективен, как лучшие из доступных химических пестицидов. После заражения насекомого *B. bassiana* выделяет боверин, циклодепсипептид-токсин. Боверин безопасен для человека и теплокровных, не вызывает ожогов у растений.

Получение боверина возможно как экстенсивным поверхностным, так и более экономичным глубинным способом ферментации. Последний, однако, является достаточно трудной технико-технологической задачей. При глубинной ферментации гриб размножается вегетативно, образуя гифальные тельца (гонидии), которые по действию близки воздушным конидиям, но уступают им в устойчивости (в процессе распылительного высушивания до 90% гонидиоспор погибает). Конидиоспоры удается получать в глубинной культуре на основе оптимизированной питательной среды. При этом до 90% выращенных клеток переходит в конидиоспоры достаточно высокой вирулентности. Культивирование гриба реализуется в строго стерильных условиях в глубинной культуре при 25-28°C в течение 3-4 суток. Питательная среда содержит (%): кормовые нелизированные дрожжи - 2, крахмал 1, хлорид натрия 0,2, хлорид марганца - 0,01, хлорид кальция 0,05. Существенное значение имеет концентрация азота, так как его дефицит снижает скорость роста, а избыток стимулирует образование гонидий. Оптимальная концентрация аминного азота составляет 10-15 мг %. Титр конидиоспор в культуре достигает 0,3-1,3 млрд./мл. Культуральную жидкость сепарируют с образованием пасты остаточной влажности 70-80% и титром спор 8 млрд./г. Пасту высушивают распылительным способом до влажности 10% и титра 8,10<sup>9</sup> клеток/г. В готовый препарат часто добавляют вещество-прилипатель и стабилизируют каолином.

Поверхностное культивирование гриба требует больших производственных площадей и более трудоемко, поэтому имеет меньшие масштабы. Способ реализуется в разных вариантах: на жидкой среде без соблюдения правил стерильности, аэрации и перемешивания; на твердой среде или жидкой среде в условиях асептики и комбинированным способом пленки. При твердофазной ферментации с использованием сусло-агара, картофеля, зерна пшеницы или кукурузы образование конидиоспор завершается на 12-15 суток. На жидких средах образование спор наблюдается через 7- 10 суток, а на 18-25 суток сформированную спороносную пленку снимают. Полученный материал высушивают, размалывают и смешивают с тальком или торфом. Производительность метода до 800 кг в месяц, титр – 1,5 10<sup>10</sup>/г. Готовая форма препарата представляет собой сухой мелкодисперсный порошок конидиоспор, смешанный с каолином, титр 1,5 млрд. конидий/г. Препарат эффективен против листогрызущих садовых титр – 1,5 млрд. конидий/г. Препарат эффективен против листогрызущих садовых вредителей, яблоневой плодовой жоржки, вредителей леса; а также вредителя картофеля - личинок колорадского жука. Используют боверин путем опрыскивания растений, норма расхода 1-2 кг/га. В сочетании с небольшими добавками химических пестицидов препарат вызывает гибель 100% личинок всех возрастов.

Перспективы грибных препаратов очевидны. Однако необходимы серьезные исследования для понимания этиологии вредителей. Это позволит предвидеть последствия взаимодействия между растением, вредителем и биопестицидом. Достижения последних лет свидетельствуют о принципиальной применимости методов генной инженерии для изучения физиологии, генетики и биохимии грибов. Это может привести к большему интересу к грибам как возможным продуцентам биопестицидов и, следовательно, к созданию более стойких и эффективных препаратов на их основе.

*Вирусные препараты.* Весьма перспективны для защиты растений энтомопатогенные вирусы. Вирусы чрезвычайно контагиозны и вирулентны, узко специфичны по действию, хорошо сохраняются в природе вне организма-хозяина. Эти препараты вследствие высочайшей специфичности практически полностью безопасны для человека и всей биоты. Заражаются насекомые вирусами при питании. Попавшие в кишечник тельца-включения разрушаются в щелочной среде. Освободившиеся вирионы проникают через стенку кишечника в клетки и реплицируются в ядрах. Вирусы способны размножаться только в живой ткани организма-хозяина. Это обстоятельство делает очень трудоемкой процедуру получения вирусного материала в значительных количествах. Получают вирусный материал при размножении вирусов в насекомых. После гибели насекомых их массу измельчают, затем выделяют вирусный материал и подвергают очистке. В соответствии с рекомендациями Всемирной Организации Здравоохранения 1973 г. особое внимание при изучении вирусов было обращено на одну группу вирусов - бакуловirusы. В этой группе отсутствуют вирусы, патогенные для позвоночных. Однако другие группы вирусов цитоплазматического полигедроза, энтомопатогенные вирусы и иридовирусы содержат потенциальные биопестициды против насекомых, поэтому сейчас рассматриваются как перспективные биопестициды.

Новые биотехнологические методы можно применять для проверки безопасности вирусов, чтобы увереннее судить об их поведении в млекопитающих. Для этого используют нуклеотидные зонды и генетическое маркирование, что было невозможно несколько лет назад.

Бакуловирусы - это двуцепочечные ДНК-вирусы, в трех их группах имеются биопестициды: вирусы ядерного полиэдроза (ВЯП), вирусы гранулеза Бакуловирусы - это двуцепочечные ДНК-вирусы, в трех их группах имеются биопестициды: вирусы ядерного полиэдроза (ВЯП), вирусы гранулеза (ВГ), фильтрующиеся вирусы.

Первый вирусный инсектицид был выпущен компанией «Сандоз» в 70-е годы. Препарат предназначен для борьбы с коробочным червем хлопчатника. Производство вирусных препаратов основано на массовом размножении насекомого-хозяина на искусственных средах. На определенной стадии развития насекомое заражают, добавляя суспензию вирусов в корм. Спустя 7-9 суток погибших гусениц собирают, высушивают и измельчают. В измельченную массу добавляют физиологический раствор (1 мл на 1 гусеницу), взвесь фильтруют. Осадок суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и заливают глицерином. Препарат стандартизируют (титр 1 млрд. полиэдров/мл) и разливают во флаконы. Одна зрелая гусеница способна дать до 36 млрд. телец-включений, что составляет до 30% ее массы. Препараты готовят в виде дустов, суспензий и масляных форм. При получении сухого препарата вирусный материал смешивают с каолином; для получения масляной формы осадок смешивают с 50% раствором глицерина до титра 2 млрд. полиэдров/г.

Существует два метода применения вирусных препаратов: интродукция вирусов в плотные популяции насекомых на сравнительно небольших площадях и обработка зараженных участков путем опрыскивания или опыления на ранних стадиях развития личинок.

Видовое название энтомопатогенных вирусов состоит из группового названия и поражаемого хозяина (например, «полиэдроз непарного шелкопряда» или «полиэдроз американской бабочки»). Отечественной промышленностью выпускается несколько вирусных препаратов; в том числе «вирина-ГЯП» (против гусеницы яблоневой плодожорки), «вирина-КШ» (против кольчатого шелкопряда), «вирина-ЭНШ» (против непарного шелкопряда), «вирина-ЭКС» (против капустной совки). В США усовершенствован процесс производства нескольких вирусных препаратов для защиты лесов («ТМ-Биоконтроль» и «Циптек»).

Вследствие достаточной трудоемкости производства эти препараты пока не нашли массового применения. Специалисты считают, что потребуются годы, чтобы вирусные препараты смогли занять значительное место на рынке биопестицидов.

Для оптимизации процесса применения вирусных препаратов необходимо выяснить распространенность вирусов в природе и характеристики их выживания. Новые методы, например, использование конкретных олигонуклеотидных последовательностей для маркировки вирусного генома, обещают существенный прогресс в этой области. Начинается применение техники рекомбинатных ДНК для введения новых последовательностей в ген оболочечных белков, который далее используется для синтеза новых белков. Эти новые белки могут включать белковые

токсины *Bacillus thuringiensis*, потенциально усиливая токсические эффекты вируса.

Новые методы биотехнологии могут повлиять на цену вирусных препаратов. В настоящее время большинство вирусов способно размножаться только в тканях насекомых, и только немногие могут расти в культуре клеток насекомых. Разработка техники клеточных культур насекомых для клеток насекомых. Разработка техники клеточных культур насекомых для размножения вирусов весьма перспективна. Для этого необходимо получение высокопродуктивных линий клеток, оптимизация питательных сред, выбор эффективных систем вирус-клетка. По этой технологии в США начато получение коммерческого препарата «Элькар». Успешно проводятся разработки по рекомбинантным бакуловирусам с генами, кодирующими водный обмен насекомых. После применения такого препарата насекомые погибают в течение 5 дней от обезвоживания либо перенасыщения водой. Обнаружен новый вирусный белок, на два порядка усиливающий эффективность вирусных пестицидов. Белок выделен из белковой оболочки гранулеза *Trichoplusiani* - бакуловируса, поражающего непарный шелкопряд, совку, волокнянку; препарат назван вирусным усиливающим фактором (VEF).

Усовершенствование и развитие технологии клеточных культур насекомых, а также отбор и даже создание новых вирусов, включая производство эукариотических вирусов в прокариотах, может повлиять на конкурентоспособность вирусных пестицидов по сравнению с химическими препаратами,

*Биогербициды.* Гербициды - химические препараты для борьбы с сорняками, составляют около 50% суммарного рынка химикатов для сельского хозяйства. Химическим гербицидам свойственны те же недостатки, что и аналогичным пестицидам. Поэтому потребность в создании биогербицидов очевидна. К последним относятся микроорганизмы-патогены растений, ферменты, а также полупродукты, получаемые биоконверсией.

Для борьбы с отдельными видами сорняков, устойчивых к химическим препаратам, применяют специфические и токсичные для них микроорганизмы. Наиболее часто используют грибные фитопатогены и грибные фитотоксины. Для расширения их сферы применения необходимо получение грибных форм, более устойчивых по отношению к изменяющимся условиям внешней среды. Бактериальные фитопатогены, менее чувствительные к факторам внешней среды, в меньшей степени поражают растения. Последние разработки в данном направлении обещают существенные перспективы. США и Япония совместно разрабатывают получение биогербицидов на основе природных микроорганизмов для борьбы с сорняками сои, арахиса, риса. В США на рынок поступил препарат на основе штамма *Phytophthora palmivora* для борьбы с повиликой. Япония начала производство биогербицида на основе билафоса, продуцируемого штаммом *Streptomyces hydropiscus*. Препарат обладает широким спектром действия.

США и Япония совместно разрабатывают получение систероцидов на основе природных микроорганизмов для борьбы с сорняками сои, арахиса, риса. В США на рынок поступил препарат на основе штамма *Phytophthora palmivora* для борьбы с повиликой. Япония начала производство биогербицида на основе билафоса, продуцируемого штаммом *Streptomyces hydropiscus*. Препарат обладает широким

спектром действия, нарушает азотный обмен в листьях и стеблях сорняков.

Наряду с биогербицидами, для защиты растений все шире применяют биологические препараты для борьбы с возбудителями заболеваний. На основе бактерий *Pseudomonas fluorescens* получен препарат «Р-2-79», подавляющий развитие свыше 40 видов микроорганизмов, поражающих пшеницу, ячмень, рожь. На основе *Pseudomonas* проводят защиту семян сорго и кукурузы от антрактоза и ризоктониоза; хлопчатника и сои от вята и ряда других заболеваний. Для борьбы с фитопфторозом яблонь предложен способ применения почвенной бактерии *Enterobacter aerogenes*. Защита многих овощных культур от заболеваний, вызываемых некоторыми видами микроскопических грибов, обеспечивается применением препарата на основе культур *Trichoderma polysporum*, *T. viride*.

В целом масштабы применения различных препаратов для борьбы с вредителями и возбудителями болезней сельскохозяйственных культур непрерывно возрастают. По разным экспертным оценкам рынок этих препаратов к 2000 году может составить от 8 до 20 млрд. долл./год.

### ***Биологические удобрения.***

Микроорганизмы играют большую роль в повышении плодородия почвы, так как в процессе роста и развития улучшают ее структуру, обогащают питательными веществами, способствуют более полному использованию удобрений.

Интенсивное растениеводство обедняет почву азотом, так как значительная его доля ежегодно выносится из почвы вместе с урожаем. С древних времен для восстановления и улучшения почв существует практика использования бобовых растений, способных в симбиозе с азотфиксирующими микроорганизмами восполнять почвенные запасы азота в результате diazотрофности (усвоения атмосферного азота). Большой положительный эффект от возделывания бобовых вызвал постановку исследований явления diazотрофности.

Впервые наличие бактерий в клубеньках на корнях бобовых растений описали Лахман в 1858 и Воронин в 1866 г. Чистая культура азотфиксаторов была получена Бейеринком в 1888 г. Вскоре были выделены и описаны другие азотфиксирующие микроорганизмы; Виноградский в 1893 г. впервые выделил анаэробную спороносную бактерию, фиксирующую молекулярный азот, назвав ее в честь великого Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*; в 1901 г. Бейеринк открыл вторую свободноживущую азотфиксирующую бактерию *Azotobacter*. Высокая продуктивность азотфиксации у *Azotobacter* стала использоваться для интродуцирования этих бактерий в почву с целью восполнения ресурсов азота. Практическое применение нашли также симбиотические бактерии рода *Rhizobium*, развивающиеся в клубеньках бобовых растений.

Как только была выяснена роль симбиотических бактерий рода *Rhizobium* в азотфиксации, стали разрабатывать способы внесения этих микроорганизмов в почву и также для инокуляции семян. Затраты на применение этих способов невелики, техника применения весьма проста, а применение нашли также симбиотические бактерии рода *Клгоотит*, развивающиеся в клубеньках бобовых растений.

Как только была выяснена роль симбиотических бактерий рода *Rhizobium* в азотфиксации, стали разрабатывать способы внесения этих микроорганизмов в почву и также для инокуляции семян. Затраты на применение этих способов невелики, техника применения весьма проста, а эффект от их применения значителен. Культивирование бобовых, положительно влияя на азотный баланс почв, также облегчает борьбу с эрозией и помогает восстанавливать истощенные земли.

*Технология получения азотных биоудобрений.* Наиболее простой способ инокуляции основан на использовании почвы после выращивания на ней бобовых растений. Этот метод разработан в конце XIX века и применяется до настоящего времени. Недостаток метода - необходимость перемещения достаточно больших объемов почвы (100- 1000 кг/га), а также возможность распространения болезней. Более эффективным оказалось применение для инокуляции семян специальных препаратов азотфиксирующих бактерий.

I Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, развиваясь в корневой системе бобовых растений, в симбиозе с ними фиксируют атмосферный азот, обеспечивая этим азотное питание растений. Согласно современным представлениям азотфиксация является восстановительным процессом превращения газообразного азота в аммиак, который в дальнейшем ассимилируется растениями с образованием аминокислот. Азотфиксирующие микроорганизмы обладают специфическим ферментом нитрогеназой, в активном центре которой происходит активирование инертной молекулы N и восстановление до NH<sub>3</sub>.

Клубеньковые бактерии обладают избирательной способностью по отношению к растению-хозяину. Эта особенность азотфиксаторов положена в основу их классификации внутри рода *Rhizobium*. Так, для бактерий *Rh. leguminosarum* растением-хозяином являются горох, вика, кормовые бобы, чина, чечевица; для *Rh. phaseoli* - фасоль; *Rh. japonicum* - соя; *Rh. trifolii* клевер; *Rh. vigna* вигна, маис, арахис и др. Процесс азотфиксации протекает только в клубеньках на корнях бобовых растений, которые образуются в результате проникновения бактерий через корневые волоски в корень. Взаимоотношение бактерий с растениями зависит от комплекса условий, включая физиологическое состояние и условия роста растений, а также физиологическую активность и вирулентность бактерий. Под вирулентностью понимают способность бактерий проникать внутрь корня растений и вызывать образование клубенька. Существенное влияние на процесс образования клубеньков, следовательно, эффективность последующего процесса азотфиксации, оказывают температура и влажность почвы, наличие в ней необходимых для развития бактерий и растений биогенных элементов.

Первая коммерческая разновидность культуры для инокуляции семян (товарное название «Nitragin») была запатентована в Великобритании Ноббе и Хилтнером в 1896 г. Для разных бобовых в то время выпускали 17 вариантов культуры. В 20-е годы выпускалось много разновидностей инокулятов, среди них были чистые культуры азотфиксирующих микроорганизмов, смеси бактерий с песком или торфом, а также культуры, выращенные на агаре или в жидкой среде.

Бактерии выращивали на агаризованных средах, далее соскабливали с

поверхности плотной среды и суспендировали в молоке. Суспензию бактерий выливали на кучу семян, перемешивали и далее семена высушивали в тени. Вскоре семена высевали. Данный метод пригоден для инокуляции сравнительно небольших объемов семян и применялся во многих странах с конца тридцатых до начала семидесятых годов. Затем с сокращением площадей, засеваемых люцерной в ряде европейских стран объемы использования метода сократились. Кроме этого, такие препараты азотфиксирующих бактерий после высушивания быстро погибают, то есть не могут использоваться в течение длительного времени. Этому недостатка лишены препараты инокулята на торфяной основе. Бактерии выращивают обычным способом в глубинной культуре в стерильных условиях до достижения достаточно высокой плотности культуры ( $10^8$ - $10^9$  клеток/мл); в качестве основы среды используют дрожжевой экстракт или маннитол. Далее просушенный (остаточная влажность около 10%), измельченный (200 меш) торф доводят до pH 6.5-7.0, добавляя  $\text{CaCO}_3$ , и смешивают с жидкой культурой (40% по массе). Препарат бактерий на торфяной основе в течение нескольких суток созревает. Затем его вновь перемешивают и фасуют в полиэтиленовые мешочки, которые герметизируют. При хранении препарата в условиях пониженной температуры жизнеспособность инокулята сохраняется достаточно долго, до 90 недель. При благоприятных условиях культуру можно хранить в течение года.

В качестве носителя для бактерий были опробованы различные композиции: смеси торфа с почвой, добавки люцерны и соломы, перегнившие опилки, бентонит и активированный уголь. В настоящее время для поддержания жизнеспособности симбиотических азотфиксирующих бактерий и используют разнообразные носители, но лучшим считается торф. Сухие препараты азотфиксаторов, приготовленные на основе клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и предназначенные для повышения урожайности бобовых растений (гороха, фасоли, сои, клевера, люцерны, люпина и др.) в настоящее время выпускаются под товарным названием «Нитрагин». Помимо почвенного нитрагина, выпускают также сухой нитрагин препарат бактерий с содержанием в 1 г не менее 9 млрд. жизнеспособных клеток, в качестве наполнителя используют мел, каолин, бентонит. Препараты сухого нитрагина с остаточной влажностью 5-7% фасуют по 0,2-1,0 кг и хранят при 15°C в течение 6 месяцев. Вносят нитрагин путем опудривания семян сухим препаратом непосредственно перед посевом. Препараты нитрагина вносят в почву на фоне минеральных и органических удобрений. При инокуляции почв нитрагином урожайность бобовых культур возрастает на 15-20%.

Аналогом азотных удобрений нитрагином урожайность бобовых культур возрастает на 15-20%.

Аналогом азотных удобрений является другой препарат азотфиксирующих бактерий «Азотобактерин», который выпускается промышленностью в нескольких вариантах. Бактерии рода *Azotobacter* являются свободноживущими азотфиксирующими микроорганизмами и обладают высокой продуктивностью азотфиксации (до 20 мг/г использованного сахара). Помимо связывания атмосферного азота, эти бактерии продуцируют биологически активные соединения (витамины, гиббериллин, гетероауксин и др.). В результате этого инокуляция



азотобактерином стимулирует прорастание семян и ускоряет рост и развитие растений. Более того, *Azotobacter* способен экскретировать фунгицидные вещества. Этим угнетается развитие в ризосфере растений микроскопических грибов, многие из которых тормозят развитие растений. Однако бактерии рода *Azotobacter* весьма требовательны к условиям среды, особенно концентрации в почве фосфатов и микроэлементов, и активно развиваются в плодородных почвах.

Технология получения сухого препарата азотобактерина аналогична получению сухого нитрагина и включает получение посевного материала и культивирование бактерий в контролируемых условиях в глубинной стерильной культуре до начала стационарной фазы. Готовый препарат с содержанием не менее 5 млрд. жизнеспособных клеток на 1 кг при остаточной влажности 5-7% фасуют в полиэтиленовые мешки 0,4-2,0 кг, которые герметизируют и далее хранят при температуре до 15°C. Промышленностью выпускаются также торфяной и почвенный препараты азотобактерина. Для этого в качестве наполнителя используют разлагающийся торф с нейтральной реакцией среды или богатую перегноем почву. В просеянную почву или торф вносят суперфосфат (0,1%) и известь (1-2%). Смесь фасуют в бутылки объемом 0,5 л, увлажняют водой до 40-60% и стерилизуют. В стерильный наполнитель вносят выросшую культуру бактерий. Длительность хранения препаратов 2-3 месяцев. При обработке семян препарат вносят из расчета 3-6 кг на 1 га пашни.

Способ применения азотобактерина определяется посевным материалом: семена зерновых культур опудривают сухим препаратом механизированным способом; клубни картофеля и корневую систему рассады овощных культур равномерно обрабатывают водной суспензией препарата.

В последние годы для изучения биологической азотфиксации стали применять методы молекулярной биологии и новейшие методы генетики. Установлена возможность с помощью колифага *P.* размножать свободноживущую азотфиксирующую бактерию *Klebsiella pneumoniae* M5 и с ее помощью трансдуцировать *nif*-гены (гены азотфиксации). Также доказано, что перенос *nif*-генов возможен с помощью плазмид от штамма-азотфиксатора к штамму, не обладающему диязотрофностью.

В последние годы для изучения биологической азотфиксации стали применять методы молекулярной биологии и новейшие методы генетики. Установлена возможность с помощью колифага *P.* размножать свободноживущую азотфиксирующую бактерию *Klebsiella pneumoniae* M5 и с ее помощью трансдуцировать *nif*-гены (гены азотфиксации). Также доказано, что перенос *nif*-генов возможен с помощью плазмид от штамма-азотфиксатора к штамму, не обладающему диязотрофностью. Обнаружены конъюгативные плазмиды, несущие гены азотфиксации, относительно легко передающиеся при конъюгации от штамма к штамму. После этого появились надежды на получение методами клеточной и генной инженерии растений, способных фиксировать атмосферный азот. Однако перенос генов азотфиксации и их экспрессия является чрезвычайно сложной задачей.

Активные исследования в этом направлении, начатые в середине 70-х годов,

пока не принесли желаемых плодов. После установления в начале 90-х гг. структуры и организации *nif*-генов усилия исследователей были сосредоточены на изучении функционирования этих генов и природы их продуктов. Вслед за открытием крупных плазмид в ряде азотфиксирующих микроорганизмов было установлено, что эти плазмиды содержат не только структурные гены нитрогеназы, но и гены, ответственные за развитие корневых клубеньков в определенных видах бобовых растений. Биохимические характеристики нитрогеназы разных азотфиксаторов сходны. Это свидетельствует о гомологичности генов, кодирующих их синтез. Гомология структуры ДНК явилась предпосылкой для клонирования *nif*-генов с целью локализации их у новых диазотрофов. Конструирование самопереносящихся плазмид, несущих гены азотфиксации, позволило передать диазотрофность нефиксирующим азот видам: *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Erwinia herbicola*, *Ps. fluorescens*; без получения экспрессии *nif*-гены были клонированы также в дрожжах.

Перенос более простых группировок генов, по сравнению с целой *nif*- областью, осуществим на основе вирусных векторов, например, вируса мозаики цветной капусты. При переносе *nif*-генов в растения возникают огромные, пока непреодолимые трудности, связанные не только с собственно переносом генов, но регуляцией их экспрессии. Однако разработанные к настоящему времени методы клонирования и рекомбинации нуклеиновых кислот создали предпосылки для переноса генов азотфиксации в клетки растений и получения их экспрессии. При переносе генов азотфиксации в высшие растения, помимо трудностей генетического характера, имеются и другие. Не изучена регуляция взаимосвязи генов фиксации азота с генами, ответственными за синтез переносчиков электронов и кофакторов, необходимых для функционирования нитрогеназы. Последняя должна быть защищена от ингибирующего воздействия кислорода.

Необходимы также интенсивные исследования генетики растений для подбора эффективных растений хозяев, а также исследования, направленные на модификацию генома микроорганизмов для получения организмов, способных существовать в симбиозе не только с бобовыми растениями (например, хлебными злаками).

Фундаментальные исследования по переносу генов азотфиксации в высшие растения, по-видимому, приведут к многообещающим открытиям и коренному перевороту практики азотного питания растений.

*Снабжение растений фосфатами.* Фосфатные ионы в почве, как известно, не очень подвижны, поэтому вокруг корневой зоны растений часто возникает дефицит фосфора. Везикулярно-арбускулярная микориза (ВА) играет существенную роль в плодородии почвы, так как способствует поглощению растениями фосфатов из почвы. Эндо- и экзомикоризы представляют собой особые структуры, формирующиеся внутри или вокруг мелких корешков растений в результате заражения почвенными непатогенными грибами.

Возникающие симбиотические отношения между грибами и растениями, выгодные растению-хозяину. Микориза ВА, образуемая грибом-фикомицетом из семейства *Endogonaceae*, встречается довольно часто в большинстве почв

практически всех климатических зон. Эта микориза присуща большей части покрытосемянных, многим голосемянным, а также некоторым папоротникам и печеночникам. Микориза ВА найдена у большинства важнейших видов культурных растений. Гифы микоризы, вырастающие из мицелия и распространяющиеся далеко за пределы корневой системы, переносят фосфатионы из зон их присутствия в клетки хозяина. Наибольший эффект ВА приносит растениям со слабой корневой системой. Благодаря этой микоризе рост растений на бедных фосфатами почвах улучшается. Одновременно с поступлением фосфатов растения также обогащаются микроэлементами. Доказано, что в растениях с микоризой концентрация гормонов роста выше, чем в ее отсутствие. Если ВА-микориза формируется в присутствии азотфиксирующих бактерий, у бобовых усиливается процесс образования клубеньков и азотфиксация.

Для размножения эндофитов в почве нужна их инокуляция. Однако размножение грибов происходит только в присутствии растения-хозяина. Единственный эффективный способ получения больших количеств эндофита - выращивание на соответствующей линии растений. Инокулятом при этом служит смесь корней мицелия и спор. Выделенные споры, инфицированную почву или корни растения с ВА используют для инокуляции растения-хозяина, свободного от болезней, в так называемой горшечной культуре. Полученный таким образом инокулят используют для инокуляции растений. Несколько граммов неочищенного инокулята, полученного из горшечной культуры растения-хозяина, добавляют в среду или размещают поблизости от молодых корней, так, чтобы до пересадки растения в грунт, успела образоваться довольно мощная микориза. Метод эффективен при разведении лесов, цитрусовых, но не находит применения для инокуляции в полевых условиях, так как препарата нужно много (2-3 т неочищенного инокулята на 1 га). Получать такие количества инокулята ВА пока не представляется возможным.

Для улучшения питания сельскохозяйственных культур фосфатами эффективен метод применения фосфоробактерина. Препарат получают на основе спор культуры *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*. Эти бактерии превращают трудно усвояемые минеральные фосфаты и фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды) в доступную для растений форму. Следует отметить, что фосфоробактерин не заменяет фосфорные удобрения и не действует без них. Положительный эффект от применения фосфоробактерина связан не только с доставкой усвояемых фосфатов к растениям, но обусловлен также действием биологически активных веществ (тиамина, биотина, никотиновой и пантотеновой усвояемых фосфатов к растениям, но обусловлен также действием биологически активных веществ (тиамина, биотина, никотиновой и пантотеновой кислот, витамина В<sub>12</sub> и др.). Данные биологически активные вещества, попадая на поверхность семян при инокуляции, а затем в ткани растения, стимулируют фосфорное и азотное питание, то есть благоприятно действуют на развитие растений на первых этапах.

Технология получения препарата фосфоробактерина во многом сходна с технологией получения сухого нитрагина и азотобактерина. Выращивание *Bac.*

*megaterium* проводят в контролируемой глубинной культуре до стадии образования спор. Процесс проводят в строго стерильных условиях, так как многие производственные штаммы чувствительны к действию бактериофагов. Высушенную в распылительной сушилке при 65-75°C биомассу с остаточной влажностью 2-3% смешивают с каолином, фасуют по 50-500 г в водонепроницаемые герметичные мешки. В 1 г препарата содержание жизнеспособных клеток не менее 8 млрд. Препарат, в отличие от нитрагина и азотобактерина, стабилен. Поэтому он хорошо хранитусвоаемых фосфатов к растениям, но обусловлен также действием биологически активных веществ (тиамина, биотина, никотиновой и пантотеновой кислот, витамина В<sub>12</sub> и др.). Данные биологически активные вещества, попадая на поверхность семян при инокуляции, а затем в ткани растения, стимулируют фосфорное и азотное питание, то есть благоприятно действуют на развитие растений на первых этапах.

Технология получения препарата фосфоробактерина во многом сходна с технологией получения сухого нитрагина и азотобактерина. Выращивание *Vas. megaterium* проводят в контролируемой глубинной культуре до стадии образования спор. Процесс проводят в строго стерильных условиях, так как многие производственные штаммы чувствительны к действию бактериофагов. Высушенную в распылительной сушилке при 65-75°C биомассу с остаточной влажностью 2-3% смешивают с каолином, фасуют по 50-500 г в водонепроницаемые герметичные мешки. В 1 г препарата содержание жизнеспособных клеток не менее 8 млрд. Препарат, в отличие от нитрагина и азотобактерина, стабилен. Поэтому он хорошо хранится при комнатной температуре длительное время. При хранении в течение года потеря жизнеспособности составляет около 20%. Фосфоробактерин особенно эффективен при применении на черноземах, богатых фосфорорганическими соединениями. Семенной материал обрабатывают сухим фосфоробактерином механизированным способом непосредственно перед посадкой. Нормы расхода препарата составляют около 5 г и 200 г наполнителя (глина, почва, зола) на 1 га. При обработке клубней картофеля используют 0,1% водную суспензию спор. Обработку проводят, равномерно увлажняя посевной материал. Применение фосфоробактерина повышает урожайность сельскохозяйственных культур на 10%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Под ред. Р. Г. Бутенко. — М., 1991.
2. Биотехнология / Под ред. А. А. Баева. — М., 1988.
3. Биотехнология растений: культура клеток / Под ред. Р. Г. Бутенко. — М., 1989.
4. Бейли Дж.Э., Оллис Д.Ф. Основы биохимической инженерии. — М., 1989.-Ч. II.
5. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. — М., 1999.
6. Бутенко Р. Г. и др. Клеточная инженерия. — М., 1987.
7. Блинов Н.П. Основы биотехнологии. — СПб., 1995.
8. Мишустин Е.Н. Биотехнология. — М., 1989.
9. Муромцев Г. С. и др. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. — М., 1990.
10. Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии. — М., 1984.
11. Рыбальский Н.Г., Скуратовская О.Д. Белковая инженерия. — М, 1990.
12. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. — М., 1987.
13. Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. В. С. Шевелухи. — М., 1998.
14. Сидоров В.А. Биотехнология растений. — Киев, 1990.
15. Фогарти М. и др. Микробные ферменты и биотехнология. — М., 1986.
16. Шабарова З.А., Богданов А. А., Золотухин А. С. Химические основы генетической инженерии. — М., 1994.

А.А. Сабанова

## **ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

учебное пособие для обучающихся по специальности  
35.02.05 Агрономия

Лицензия: ЛР. № 020574 от 6 мая 1998 г.

Электронная версия 2023 г.

Бумага формат А4 (210x297 мм), масса 80 г/м<sup>2</sup>.

Усл. печ.л 18,6. Заказ

---

362040, Владикавказ, ул. Кирова, 37.  
Типография ФГБОУ ВО Горский ГАУ